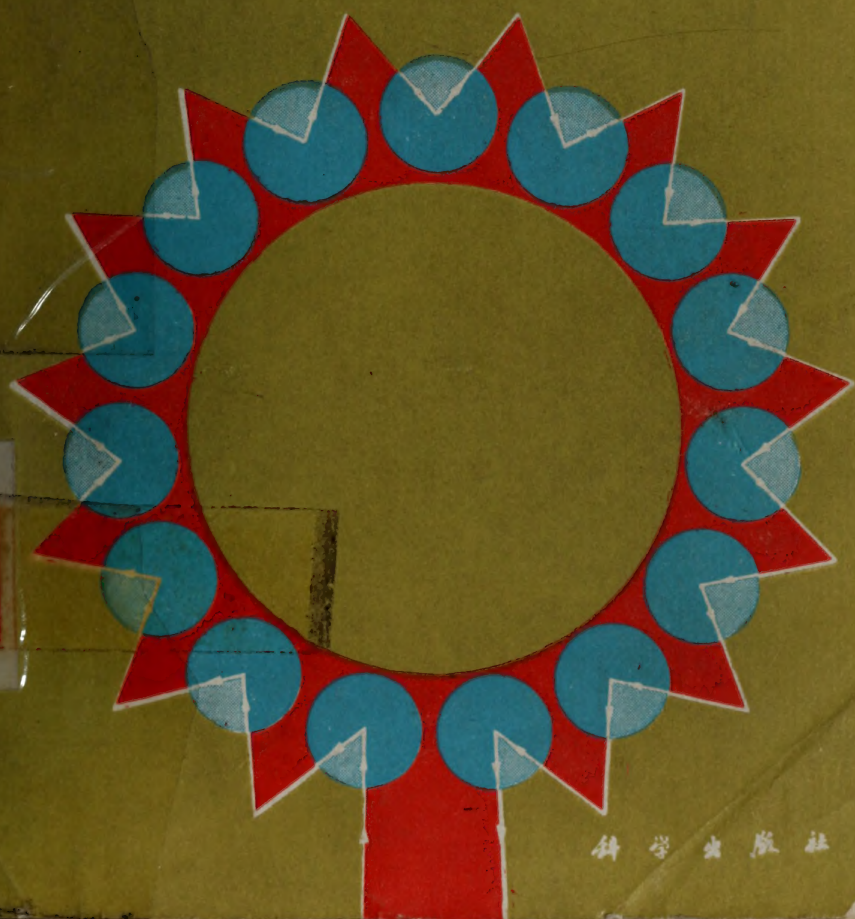
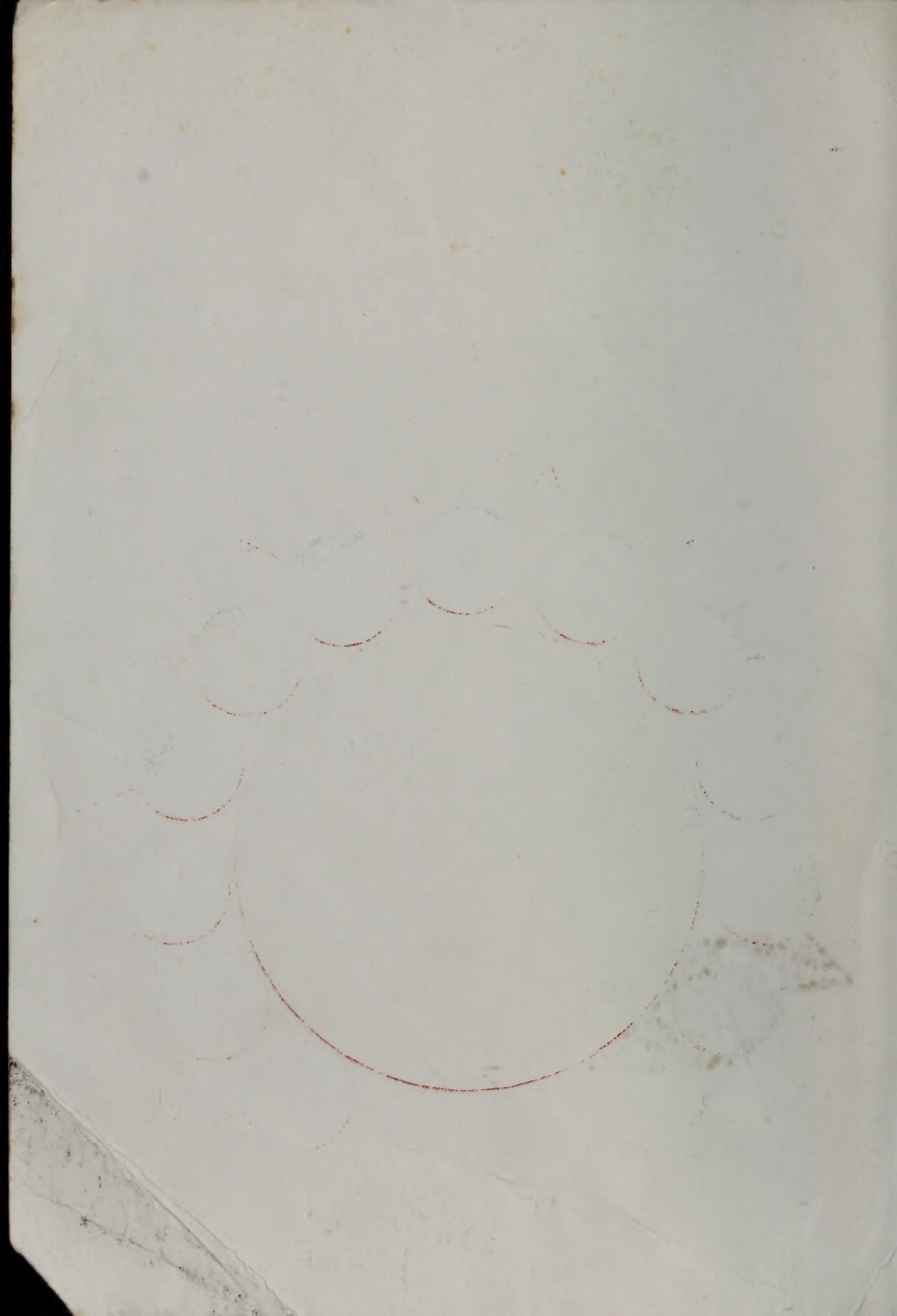


酶生物技术手册

A. 怀斯曼 主编



科学出版社



58.17435

247

酶生物技术手册

A. 怀斯曼 主编

徐家立 戴有盛 译
孙万儒 张启先



科学出版社

1989

25058

中科院植物所图书馆



S0011913

内 容 简 介

本书以简明的形式概述了工业酶利用的原理和实践,反映了当前国际上酶技术发展的现状。全书分两大部分。A部分是工业酶生产和利用的原理,内容包括酶的大规模提纯,工业酶学原理,固定化酶原理,临床分析用酶。B部分是酶和细胞的工业应用,包括蛋白质的纯化,酶的工业应用,固定化酶和生物亲和方法技术,酶在临床分析中的应用资料。前后两部分相应章节内容密切相关。全书附有大量参考文献和技术资料,不失为酶技术领域一本有应用价值的参考书和工具书。

本书可供生物化学、微生物学、化学工程、有机化学、临床化学、制药等方面的科研和生产人员,以及有关大专院校师生参考。

A. Wiseman

HANDBOOK OF ENZYME BIOTECHNOLOGY

Second Edition

Ellis Horwood Limited, 1985

酶生物技术手册

A. 怀斯曼 主编

徐家立 戴有盛 孙万儒 张启先 译

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京市东黄城根北街16号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1989年7月第一版 开本:787×1092 1/32

1989年7月第一次印刷 印张:15 3/4

印数:0001-31380 字数:359000

ISBN 7-03-001063-9/Q·162

定价:12.40元

译 者 的 话

《酶生物技术手册》第二版是在第一版(1975年)问世后10年和读者见面的。在这10年中,不断发展的酶技术取得不少重要进展,当时的许多理论上的可能性已经成为现实,有的已达到工业化程度,其中以固定化酶和临床诊断酶的发展更为突出。在酶的大规模制造及许多工业利用的理论和实践的新信息不断涌现的今天,第二版及时反映了这一领域的进展。

本书分两部分介绍自然酶和固定化酶利用的原理和实践,每部分各有5章,前后两部分相应章的内容又密切相关。编法新颖,叙述简明扼要,引证了大量资料,因而不仅是酶技术领域中具有重要应用价值的工具书,也是一本重要的进展性专著。

本书的主编英国 Surrey 大学生物化学系的 A. 怀斯曼博士,在蛋白质和发酵工业领域中积累了丰富的研究经验,已发表了上百篇研究报告,并编写了包括本书第一版在内的酶和发酵方面的15部专著。

酶技术是我国今后要大力发展的生物技术中不可少的部分。近年来,国内以酶制剂的生产和应用为核心的酶利用也得到迅速发展。我们希望本书的出版,能为我国从事酶技术研究、生产和应用的科技工作者和大专院校师生,提供一份有价值的参考资料。

本书由中国科学院微生物研究所徐家立、孙万儒、张启先和辽宁师范大学生物系戴有盛翻译。吉林大学分子生物学系

李青山和徐家立分别对全书进行了校订。译文中不妥之处希望读者指正。

前言

本书是根据作者多年从事《...》的教学和科研工作的经验编写而成的。在编写过程中，参考了国内外许多有关文献，并得到了许多同志的帮助，在此表示衷心的感谢。

本书共分...章，...节。第一章...第二章...第三章...第四章...第五章...第六章...第七章...第八章...第九章...第十章...第十一章...第十二章...第十三章...第十四章...第十五章...第十六章...第十七章...第十八章...第十九章...第二十章...第二十一章...第二十二章...第二十三章...第二十四章...第二十五章...第二十六章...第二十七章...第二十八章...第二十九章...第三十章...第三十一章...第三十二章...第三十三章...第三十四章...第三十五章...第三十六章...第三十七章...第三十八章...第三十九章...第四十章...第四十一章...第四十二章...第四十三章...第四十四章...第四十五章...第四十六章...第四十七章...第四十八章...第四十九章...第五十章...第五十一章...第五十二章...第五十三章...第五十四章...第五十五章...第五十六章...第五十七章...第五十八章...第五十九章...第六十章...第六十一章...第六十二章...第六十三章...第六十四章...第六十五章...第六十六章...第六十七章...第六十八章...第六十九章...第七十章...第七十一章...第七十二章...第七十三章...第七十四章...第七十五章...第七十六章...第七十七章...第七十八章...第七十九章...第八十章...第八十一章...第八十二章...第八十三章...第八十四章...第八十五章...第八十六章...第八十七章...第八十八章...第八十九章...第九十章...第九十一章...第九十二章...第九十三章...第九十四章...第九十五章...第九十六章...第九十七章...第九十八章...第九十九章...第一百章...

本书可作为高等院校...专业及相关专业的教材，也可供从事...工作的工程技术人员参考。

目 录

译者的话

A 部分 工业酶分离和利用原理

第 1 章 引言	(1)
1.1 概述	(1)
1.2 «酶生物技术手册» A 部分: 工业酶分离和利用原理引言	(2)
第 2 章 酶和其他蛋白质的大规模提取和纯化	(4)
2.1 引言	(4)
2.2 化学方法提取	(5)
2.3 物理方法提取	(9)
2.4 分离和纯化	(15)
第 3 章 工业酶学原理: 可溶性酶和固定化酶在工业过程中应用的基础	(48)
符号与术语	(48)
3.1 引言	(52)
3.2 酶活性测定	(54)
3.3 辅因子	(55)
3.4 酶作为催化剂的显著特点	(56)
3.5 酶的催化作用	(58)
3.6 酶动力学	(62)
3.7 pH 对酶活性的影响	(66)
3.8 温度对酶活性的影响	(66)
3.9 酶抑制作用	(67)
3.10 酶催化剂的各种类型	(69)
3.11 酶与化学催化剂的比较	(70)

3.12	酶与发酵的比较	(71)
3.13	固定化生物催化剂	(72)
3.14	固定化酶和固定化细胞的比较	(78)
3.15	固定化载体及方法的评价	(82)
3.16	共固定化酶	(85)
3.17	两相反应	(87)
3.18	工业酶动力学	(90)
3.19	效率因子	(94)
3.20	稳态动力学	(95)
3.21	酶的固有活性——修饰因子	(99)
3.22	辅因子再生	(106)
3.23	生物化学反应器	(107)
3.24	反应器的酶动力学	(119)
3.25	非理想态流动对生物化学反应器性能的影响	(125)
3.26	使用固定化生物催化剂的生物化学反应器中的物理学 问题	(128)
3.27	固定化生物催化剂的稳定性	(133)
3.28	放大	(143)
3.29	讨论	(145)
	证据说明	(146)
第 4 章	酶的固定化原理	(147)
4.1	固定化酶的分类	(147)
4.2	酶固定化技术	(148)
4.3	固定化方法的选择	(191)
4.4	固定化酶性质的概述	(193)
4.5	酶反应器概述	(196)
4.6	应用及发展趋势	(200)
第 5 章	临床分析用酶——原理	(205)
5.1	引言	(205)
5.2	底物浓度的酶法测定	(208)
5.3	酶的测定	(219)

5.4	固定化酶测定底物浓度	(223)
5.5	酶免疫测定 (ELA)	(234)
5.6	展望	(243)

B 部分 酶和细胞的工业利用

第 1 章	酶利用引言	(245)
第 2 章	大规模蛋白质提纯的实用概况	(246)
2.1	引言	(246)
2.2	酶失活作用	(247)
2.3	容器和附属设备	(248)
2.4	液体输送	(250)
2.5	细菌破碎	(251)
2.6	离心	(255)
2.7	切线流过滤作用	(259)
2.8	浓缩	(260)
2.9	层析	(263)
2.10	亲和层析	(276)
第 3 章	酶的工业应用	(279)
3.1	引言	(279)
3.2	酶的生产	(282)
3.3	酶的用途	(285)
3.4	酶的来源	(295)
3.5	酶的分离、纯化和配制	(298)
3.6	酶使用的法规	(301)
3.7	酶的制造厂	(304)
3.8	生物化学应用	(309)
3.9	酶在分析中的应用	(312)
3.10	酶的医药用途	(324)
3.11	酶作为催化剂在有机化学上的应用	(325)
3.12	限制性内切核酸酶	(335)

3.13	生物化学加工	(338)
3.14	酶在食品工业中的应用	(340)
3.15	酶在提取天然产物中的应用	(389)
3.16	解毒酶	(390)
3.17	加酶去垢剂	(393)
3.18	用酶作清洗剂	(394)
3.19	制革工业	(394)
3.20	纺织	(395)
3.21	造纸	(395)
3.22	抗生素	(396)
3.23	青霉素酰化酶	(396)
3.24	头孢霉素	(399)
3.25	生物催化剂的其他用途	(400)
3.26	结论	(401)
	证据说明	(402)
第4章	酶固定化和生物亲和方法的技术资料	(405)
4.1	引言	(405)
4.2	包埋	(405)
4.3	载体结合	(409)
4.4	交联	(440)
4.5	固定化细胞	(442)
4.6	其他固定化的生物活性分子	(444)
第5章	酶在临床分析中的应用——资料	(448)
5.1	引言和感谢	(448)
5.2	在临床化验室中用酶法测定底物	(448)
5.3	在临床化验室中用偶联酶系统测定酶	(457)
5.4	用固定化酶测定底物	(463)
5.5	酶用于酶免疫测定法 (EIA)	(464)
	参考文献	(467)

A部分 工业酶分离和利用原理

第1章 引言

A. 怀斯曼

1.1 概述

A. 怀斯曼编辑的《酶生物技术手册》第一版是1975年由埃利斯·霍伍德 (Ellis Horwood) 出版公司出版的。这本十分成功的手册后来被译成日文(1977)和捷克文(1981)。该书第一部分包括酶的生产和利用原理,第二部分是酶在工业和其他方面的资料集。尽管这本原始资料集中提到许多论题,但只对少数作了详细分析。因此,埃利斯·霍伍德公司从1977年开始,又陆续出版一套《酶和发酵生物技术论题集》系列丛书。

论题集1(1977)综述了连续培养酶的合成,生物材料的泡沫分离,培养液通气,抗生素酶法改良,专利文献,葡萄糖异构酶,细胞色素 p 450。论题集2(1978)综述了酶在无机载体上的固定化,酶电极和酶基传感器,使抗生素失活的酶,水中废物的生物处理,酶稳定化。论题集3(1979)综述酶平衡置换中含氧阴离子的用途,微生物胞外酶,凝乳酶和干酪的开发,发酵过程的放大和新型改良转化酶及其应用。论题集

4(1980) 综述酶用于疾病治疗, 蛋白分解酶的医药用途, 固体基质发酵, 过程变量的测定, 固定化微生物细胞。论题集 5(1981) 综述了固定化辅酶, 酶的大规模提取和回收, 短杆菌肽 S, 木瓜蛋白酶, 醇脱氢酶。论题集 6(1982) 综述了 4-羟基香豆素抗生素, 微生物的次级代谢, 酶稳定化, 啤酒发酵, 微生物加氧酶。论题集 7(1983) 综述了固定化动植物细胞酶作用的无序大分子结构, 硫酸化表面活性剂生物降解中的生物酶, 嗜热细菌, 厌气细菌, 纤维素分解细菌, 单克隆抗体, 固定化酶用于水和空气净化, 利用食品废弃物发酵过程的局限性。论题 8(1984) 综述了木聚糖酶: 功能特性和应用, 废水中含氮污染物的生物控制, 计算机和微处理机用于工业发酵。论题集 9(1984) 综述了利用烃的微生物的生理学, 活性染料在生物技术和生物化学中的应用, 固定化酶在酶结构和功能基础研究中的应用, 酶及模拟酶设计的进展。论题集 10(1985) 正在印刷。

从《酶生物技术手册》第一版问世以来的 10 年中, 许多理论上的可能性已变成现实。然而为数众多的可行性还未达到工业化程度, 至今可以查明的原因也许是仍然缺乏获得成功所需要的真正的科学信息。另一个原因是任何时期总会提出的工艺过程的经济问题。

本手册从广义上再次简明地概述了与工业酶有关的原理和实践, 并且把范围扩大到临床化验的酶类, 这些化验室反复使用的酶法分析过程已构成工业酶总需求的一部分。

1.2 《酶生物技术手册》A 部分: 工业酶 分离和利用原理引言

随着各种形式固定化酶应用的发展, 酶利用中所涉及的

一些最重要的原理变得更清楚了。针对要形成产物这一特定要求,需要修改许多经典的酶动力学,同时,在每一过程中,酶学的主要特征也不得不重新确立。在本部分,酶的稳定性和稳定化常常是极其重要的〔见A部分3.27和4.4两节,以及Mozhaev和Martinek的综述(1984)〕。

酶是以活性而不是以重量购销的,因此没有必要使用比某特定工艺所需纯度高得多的酶,或经过修饰的酶,否则花费太高。然而抑制剂的存在会对酶的作用特别是酶动力学的预测产生困难,但在决定过程是否可以大规模进行时,可不考虑这一点。

许多重要原理是与使用各种各样的固定化酶反应器有关的,这对评价固定化酶和固定化细胞特有的应用是很重要的(见A部分第3章)。但首先需要成功地分离出酶(见A部分第2章)并加以固定(见A部分第4章)。然而,酶的某些最复杂的应用是在临床生化方面。抗体的使用使许多特殊技术(如酶免疫测定,见A部分第5章)得以发展。资料、使用细节和应用等可参阅本书B部分。

第2章 酶和其他蛋白质的大规模提取和纯化

M. D. 斯卡温 J. 梅林

2.1 引言

在最近出现的生物技术热潮中,人们不仅重视发酵技术,而且十分强调遗传学领域中的新进展。但是生物工程学家始终把蛋白质的提取和纯化技术作为生物技术中不可分割的一部分。近几年来,为了从微生物培养物中提纯一系列蛋白质,越来越需要将蛋白质纯化技术与大规模发酵过程联系起来。发酵产品有时可达几千升的规模。用于病人治疗的蛋白质产品需要一些特殊要求,这些特殊性不可能在专门讨论纯化问题的章节中完全涉及到。但是通常需要标准很高的卫生和工艺过程的控制。另外,对于可能造成终产物污染的技术或材料,必须按照产品的安全性规定和法规审定部门的要求进行认真评价。

本章主要讨论微生物来源的蛋白质的分离和纯化,但是所述的这些技术同样有效地适用于动植物组织来源的蛋白质的提取。

在实际应用上,细菌蛋白质可以分为胞外蛋白质和结合或游离形式的胞内蛋白质。尽管胞内蛋白质的提纯要有破碎细胞的过程,可是细胞破碎之后,这两类蛋白质的提纯步骤就不存在本质的差别了,只是提纯胞内蛋白质时,样品体积比胞外蛋白质小一些。

在介绍与蛋白质分离和纯化有关的各种方法之前,有必要考虑小规模工艺过程和大规模工艺过程之间的关系。蛋白质提取技术有多种,但并不是都适合于大规模的操作过程,这是由于技术和仪器本身存在的固有局限性,或者由于扩大工艺规模使时间延长而造成的。例如超声波处理、冻融、研磨或固体剪切等方法能有效地破碎细菌,但是扩大这些技术的使用规模,多数是不实用的,有些也是结果不佳。同样,离心方法是很有价值的实验室技术,但在大规模生产中不便使用。

对于大规模工艺过程的定义,可以有不同的理解,本章指的是处理1千克或1千克以上湿细胞的工艺过程。“提取”一词指的是破碎微生物细胞的方法,“分离”和“纯化”指的是获得纯品或特殊产物有关的其他技术[参见 Darbyshire (1981) 的综述和 Bucke (1983) 的导论性综述]。

2.2 化学方法提取

2.2.1 碱

这种方法用在各种细菌的小规模和大规模提取中都相当成功。Wade(1968)将细菌置于 pH 11—12.5 的碱液中 20 分钟,提取治疗用的 L-天冬酰胺酶 (EC. 3.5.1.1)。Salton (1964)报道,在植物、真菌和细菌细胞壁制备过程中,用碱处理,水解是相当彻底的,甚至象细胞色素 c 这样的膜结合成分也释放出来了。碱处理成功与否取决于所需酶在高 pH 下的稳定性。他还指出,此法可以使蛋白酶失活,也可减少医用酶制剂的热源污染。这种方法应用于遗传工程微生物的快速失活和溶胞作用过程中。

2.2.2 溶菌酶和 EDTA

溶菌酶是用鸡蛋清作原料产生的商品酶，它专一催化细菌细胞壁粘肽部分的 β -1, 4-糖苷键的水解。细胞壁刚性强的革兰氏阳性细菌对这种酶的敏感性要比革兰氏阴性细菌高，在很大程度上刚性是来自细胞壁的粘肽。当细胞壁崩解后，最终使细胞外膜破裂却常常取决于悬浮介质的渗透压。单独使用溶菌酶破碎革兰氏阴性细菌的细胞壁是很难成功的。EDTA (乙二胺四乙酸) 是必需的添加物，因为 EDTA 可使革兰氏阴性细菌细胞外膜上的脂多糖释放出来 (Grag 和 Wilkinson, 1965)。一般认为 EDTA 分子螯合了维持细胞壁稳定必需的二价阳离子，这样使溶菌酶可以进入并且作用于粘肽层 (Edwards 和 Noller, 1964)。

此项技术很少用于细菌酶的大规模提取，因为溶菌酶的价格较高，但要低于纯化后的酶价。粗制鸡蛋清要便宜得多，而且常常同样有效，已有人用固定化溶菌酶来做实验 (Dunnill 和 Lilly, 1972)。溶菌酶法是一种使细胞溶解的非常温和的方法。在使用物理方法溶解细胞的操作中，如果酶对温度升高敏感，使用溶菌酶方法是有利的。近来已采用溶菌酶溶解荧光假单胞菌，从中提取芳基酰基水解酶 (Hammond 等, 1983)。

2.2.3 去垢剂

去垢剂 (detergent) 有离子型的，如十二烷基硫酸钠(阴离子型)和十六烷基溴化铵(阳离子型)，或非离子型的，如吐温和去利通 (Triton)。在低离子强度和合适的 pH 条件下，去垢剂与脂蛋白结合形成胶束 (Morton, 1955)。因而生物膜的脂蛋白组分可以溶解下来或使膜变成可通透的。去垢

剂-脂蛋白复合物形成的机理至今仍未完全搞清,但认为与静电(盐键)和范德瓦尔斯力(Klevens, 1950)有关。这些复合物的形成似乎与 pH 和温度密切相关。

离子型去垢剂的反应性比非离子型的强,可导致脂蛋白解聚。这又会进一步导致蛋白质变性、沉淀,甚至发生肽键水解(Putram, 1948)。因此,在酶提取中去垢剂的效果不理想。此外,存在去垢剂也会使盐沉淀蛋白质出现困难。这些问题大多数可用离子交换层析来解决(Tzagoloff 和 Penefsky, 1971)。

尽管如此,在某些提取过程中,去垢剂确实有重要的用处。Morris 和 Darlow (1971)指出了去垢剂在病毒颗粒分级分离中的用途;TritonX-100 用于大规模解脱诺卡氏菌体的胆固醇氧化酶(Buckland 等,1974);胆酸钠用于溶解支链淀粉酶(霉菌多糖-6-葡聚糖水解酶),这是肺炎克雷伯氏菌完整细胞上的膜结合酶(Kroner 等,1978)。用去垢剂提取酶的详细资料可参考《酶学方法》22 卷第 229 页(Methods in Enzymology, 22, p. 229)的实用简表,以及皇家化学协会以专家定期报告形式出版的《氨基酸、肽和蛋白质》近期的一些卷本(例如 1982 年 14 卷)。

2.2.4 冷冲击

Sherman 和 Albus (1923)最先观察到冷冲击(cold shock)(从正常生长温度迅速降低到 0℃)效应。有关文献指出,革兰氏阴性细菌对冷冲击要比革兰氏阳性细菌敏感(Hagen, 1971)。这种只在特定条件下出现的效应会导致生活力丧失,而且使 260 nm 处有吸收的物质如氨基酸、ATP 释放到周围的介质中(Strange 和 Dark, 1962; Strange 和 Ness, 1963; Strange, 1964)。

作为一种细菌破碎技术,冷冲击法很难在大规模中使用。它主要受两方面因素限制,首先是对密度大于 $10^8/\text{ml}$ 的细胞悬浮液的作用甚微或根本无作用 (Strange, 1964); 其次是在指数生长期的细菌对冷冲击要敏感得多 (Gorill 和 Mc-Neil, 1960)。此外,要使它在大规模使用中获得成功,需要一定大小的容器和复杂的装备,这是难以办到的。

2.2.5 渗透冲击

渗透冲击 (osmotic shock) 法用于从一些革兰氏阴性细菌 (包括鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌) 提取水解酶和结合蛋白质 (Neu 和 Heppel, 1967; Heppel, 1967, 1969), 以及使 T(even) 噬菌体蛋白外壳破碎而释放出 DNA (Anderson, 1949)。此法包括用缓冲溶液洗细菌以去掉生长培养基, 接着把菌细胞重新悬浮在 20% 蔗糖的缓冲溶液中, 使菌细胞平衡, 使胞内水分部分失去, 再用离心的方法从悬液中取出菌细胞, 将所得的菌细胞浆快速分散在约 4°C 的水中。已经表明细胞内渗透压突然增高会引起某些细胞成分的释放 (Cedar 和 Schwantz, 1967)。显然, 在某种意义上, 渗透冲击法与冷冲击法类似。

渗透冲击法通常使细胞生存能力急剧下降, 但只能释放出细菌总蛋白量的 4—7%。如果需要纯化的酶位于周质区, 渗透冲击法和冷冲击法都值得考虑, 因为与其他细胞破碎技术比较, 提纯程度可提高 14—20 倍 (Charm 和 Matteo, 1971)。现已证实, 渗透冲击法提取周质氨基糖苷钝化的酶 (如大肠杆菌的卡那霉素乙酰转移酶) 是特别有用的 (Haas 和 Dowding, 1975)。

渗透冲击法也是一种使海洋细菌酶释放的有用技术, 如从费氏发光杆菌释放出来的虫荧光素酶 (Gunsulas Miguel

等, 1972)。在提取海洋细菌酶时, 只需把细胞再悬浮于稀缓冲液中, 即可达到溶胞作用, 因为在其生长基质中含有 30g/l NaCl。渗透冲击不适用于革兰氏阳性细菌酶的释放, 可用下列事实来解释其部分原因, 一些革兰氏阳性球菌的内渗透压高达 20 个大气压 (Mitchell 和 Moyle, 1956)。革兰氏阳性细菌是以刚性的粘肽层来维持细胞完整性的, 并使这些细菌经受得住如此大的内渗透压。而革兰氏阴性细菌却不能保持这样的内渗透压。

2.3 物理方法提取

2.3.1 超声

超声是指音频超过人听觉的声音, 其音频在 20 千赫和 20 千赫以上。如果用波长来表示, 液体中的超声波波长范围是 $6-2.4 \times 10^{-4}$ cm, 可归入与可见光类似的量级。

超声作用于液体会产生一种称为空穴作用的现象, 出现压缩区和稀疏区, 稀疏区中形成的空穴在稀疏区转到压缩区时迅速崩解。这样, 空穴中产生的气泡被压缩达到几千个大气压, 紧接着崩解形成冲击波。通常认为此冲击波是这个方法产生破坏力的主要因素。Pollard (1953) 综述了这个方法与病毒破碎有关的物理学原理。

超声振荡器已成功地应用于许多提取过程。Salton (1953), Bosco (1956), Ikawa 和 Snell (1960) 都用此法制备细菌细胞壁。超声对原生动物纤毛虫和常见的水草伊乐藻的作用是属于非选择性的破碎方式之一 (Bergmann 和 Hatfield, 1938)。

Hugo (1954), Marr 和 Cota-Robles (1957) 综述了这种与酶释放有关的细胞解体的方法。然而, 应当指出, 某些细

菌如链球菌 (Datta 和 Penefsky, 1970) 对超声破碎有很强的抵抗力。此外, 与电子传递系统相关的那些膜结合蛋白类的增溶过程需要长时间处理才能够完成。

超声处理的效率取决于各种环境因素, 除处理时间外, 还有悬浮介质的 pH、温度 (Datta 和 Penefsky, 1970) 和离子强度 (Penefsky 和 Tzagoloff, 1971)。目前, 基本上是靠经验来选定处理条件, 而且所用的条件又随着产物和生物种类的不同而改变。

虽然已经证实超声处理是实验室规模研究工作有效的和用途广泛的方法, 但因难于将足够的动力传送到大体积的悬浮液, 因此, 超声处理破碎细菌的量受到限制。

2.3.2 冻融

冻融对微生物的作用在某些方面与冷冲击和渗透冲击作用相似。此法除快速冷却及细胞内外溶质浓度效应以外, 细胞内和细胞外形成的冰晶使细胞进一步受损坏。Mazur (1969, 1970) 论述了冷冻引起损害的各种物理化学变化。对一般的蛋白质释放来讲, 冻融的效率是有限的。通过一次冻融处理, 即使是革兰氏阴性细菌, 也只能释放出不到总可溶性蛋白的 10%, 但是周质间隙的蛋白质很容易释放出来。大肠杆菌细胞冻融一次后, 高达 60% 的 R 因子调控的青霉素酶出现在上清液中 (Melling 未发表的结果)。由于在提取和纯化酶之前, 细菌体通常是在 -20°C 条件下贮存的, 冻融常常 (也许是无意地) 是作为其他细胞破碎的附加方法。

冻融可以引起酶活性损失。Cowman 和 Speck (1969) 证实各种乳链球菌菌株在冻融后贮存 (30°C) 10 天, 它们的蛋白酶活性下降。Speck 和 Cowman (1969) 指出, 这种失活与酶结构改变有关。已发现冻融后在 22°C 贮存的膜结合蛋

白酶是以有活性的单体和二聚体形式存在,但在 30℃下贮存一天,酶分子就聚合成无活性的高分子量多聚体。Hanafusa (1969) 证明了腺苷三磷酸酶的变性和失活。此外发现,尽管过氧化氢酶结构没有明显变化,但活性有明显损失。这些结果表明,使用这种方法提取酶时可能会遇到相当大的困难。另外,大批量冷冻后的融化和再悬浮也会出现困难,除非用小批量对菌体进行分批冷冻。

2.3.3 固体剪切

Buchner 和 Hahn (1903) 首先采用固体剪切法破碎微生物以抽提酶。即将酵母浆和硅藻土混合,然后加液压。硅藻土起磨料作用,加压以后酶就释放出来。在“醇发酵”资料中可查到有关研究的早期工作的综述 (Harden, 1923)。

Hughes (1951) 建立起螺旋压力机 (fly press) 方法。把细菌体和磨料混合,或把细菌体冷冻到 -20℃,冷冻生成的冰晶作为磨料。再把这些菌体放入金属块上的圆孔内,插上密接的金属塞。向塞顶施加 10—15 吨 (150—230MPa) 每平方英寸¹⁾ (6.45 cm²) 的压力。采用此法能使特定的悬浮液中的细胞破碎达到很高的百分数 (Hughes, 1951; Hugo, 1954; Hunt 等, 1959; Hughes, 1962)。Fraser (1951) 采用 Hughes 螺旋压力机和冻融交替处理,成功地从细菌内生孢子中得到酶制剂。Eaton (1962) 对金属块作了改进,把金属块分成两片,这样破碎细胞几乎可以全部回收。但是即使使用带有 2 到 3 个金属塞的金属块,所能处理的细胞量也只是 30 g 稍多一点,因而此法不可能用于大规模细胞破碎 (Hughes 等, 1971)。

Edebo (1969) 发展了一种 X 压榨机 (X-press), 它每

1) 1 英寸 = 0.0254m。

分钟能加工 100g 酿酒酵母。这是把冷冻细胞通过一个多孔圆盘而达到破碎的,孔的出口处的温度约为 -22°C 。细胞的破碎是由于受挤压的细胞通过小孔所产生的剪切力造成的,冷冻细胞浆中形成的冰晶有助于剪切的产生。已证实固体剪切细胞破碎是获得酶蛋白和细菌细胞壁制剂的优良方法。

Magnusson 和 Edebo (1976) 设计制造出一种大型的固体剪切粉碎机,这种设备每小时能破碎 10 kg 酵母浆。细胞可以在 -20°C 下破碎,这对提取热不稳定酶是有好处的,但作为常规操作这种装置则显得过于复杂。

2.3.4 与磨料一起研磨或搅拌

Booth 和 Green(1938) 发展了一种破碎细菌的研磨机,但对细菌酶的释放并不理想,如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌需处理 2 小时,滕黄八叠球菌需处理 4 小时。

Curran 和 Evans (1942), King 和 Alexander (1948) 研究了有玻璃珠存在的搅拌破碎细菌的方法。King 和 Alexander (1948) 指出了破碎细菌的最适条件为(a)玻璃珠直径 0.13—0.26 mm, (b) 每分钟 300—500 次, (c) 振幅为 6 cm。

Mickle (1948) 发展了一套用途广泛的破碎微生物的装置。其最普遍的用途是制备微生物细胞壁,这些细胞壁是从细菌 (Salton 和 Horne, 1951)、细菌孢子、分枝杆菌、真菌 (Salton, 1964) 获得的。这种装置是由悬挂在各种不同长度的臂末端带锯齿的玻璃杯组成的。将 10 ml 细菌悬液 (10—20mg 蛋白质/ml) 与等体积的玻璃珠 (Ballatini 珠, 直径 0.1—0.2 mm) 一起放在玻璃杯中,然后在每秒 50 次的频率下振荡。可在冷室中操作以防过热。细胞破碎程度主要凭经验来判断。Shockman 等 (1957) 描述了一种原理与 Mickle 法 (1948) 类似的方法,此法每次可处理 6 g 材料。

虽然上述方法只适用于少量细菌,但同一原理已用来破碎较大量的细菌。Rehacek 等(1969)记述了能强烈搅拌含有玻璃珠的细菌悬浮液的装置。Rehacek (1971)报道了对含有玻璃珠的原始分离系统原型所作的改进,使细菌悬浮液能够流过填装有玻璃珠的小室,从而达到连续运转。

Rehacek 等(1969)认为破碎效应是速度梯度间产生的剪切力造成的,这种梯度起因于流线作用。此外,除不同速度下滚动的小珠之间有研磨作用外,生物体和小珠之间还存在互相碰撞。细胞破碎程度取决于搅拌速度、微生物浓度、玻璃珠大小、浓度以及接触时间。

现已证实,根据这些原理制造的生产装置(Dynomill, W. A. Bachofen, 瑞士)是破碎某些“硬”细菌的最有效的方法,这些“硬”细菌包括变异链球菌、溶血链球菌(Melling 等, 1973 a)、金黄色葡萄球菌和溶壁微球菌。用配备有 600 ml 连续流动研磨器的实验室规模的装置,每小时能处理 5 kg 这样的细菌菌体。Dunnill 和 Lilly (1972)讨论了各种参数对酵母细胞破碎的影响; Marfy 和 Kula (1974)研究了各种条件下啤酒酵母中几种酶的释放。Rehacek 和 Schaefer(1977)研究了酵母细胞在新型搅拌器中的破碎过程。这种搅拌器的搅拌圆盘是交替地以垂直和倾斜的方式安装在转动轴上,据说这种安排是最有效的。近来, Woodrow 和 Quirk (1982)研究了装备有 600 ml 连续流动研磨容器的达诺磨释放多种细菌酶所必需的最适条件。达诺磨型细胞破碎器具有以下突出的优点,即破碎致病的或遗传工程微生物时,可把装置方便地组装在安全舱中。

2.3.5 液体剪切

Milner 等(1950)用液体剪切系统来破碎叶绿体。悬液

在高达每平方英寸 137 MPa 的压力下通过针阀，流速为 10 ml/min。大肠杆菌的破碎可用谷氨酸脱羧酶活性的增加体现出来。Ribi 等 (1959) 采用每平方英寸 275 MPa 的装置改进了这个方法。用气态 CO₂ 把出口处温度控制在 15°C，此装置能处理 300 mg 细菌蛋白质。

近来已采用 APV Manton Gaulin 匀浆器连续破碎细菌。此机器是一台配有节流孔可调阀的排液泵。液体悬液中的细胞在 55 MPa 压力下通过匀浆器。看来造成细胞破裂有三种明显不同的机理。用排液泵使细胞通过单向阀，接着在选定好的操作压力下冲击匀浆器阀，然后通过联结在匀浆器阀和冲击环上的狭道。就是在这点上产生最大的剪切力。在悬浮液通过出口处时，压力迅速回降到正常的大气压。压力的突然下降是施加在悬浮液上的第三种力，而且具有破碎作用。Charm 和 Matteo (1971) 指出了使用匀浆器的三种方式：单纯通过；批式循环；连续循环和流出。他们也给出测定完整细胞残留数和方法加工过程总速率的公式。酵母细胞破碎释放出的蛋白质可用一级速度公式表示 (Follows 等, 1971)。

$$\lg(Rm/Rm - R) = KNP^{2.9}$$

R = 以克表示的每克装填细胞释放出的可溶蛋白质质量

Rm = 释放出的可溶蛋白质最高量

K = 依赖于温度的速率常数

N = 悬液通过机器的次数

P = 操作压力

2.9 = 功率变动

虽然发现蛋白质释放与细胞破碎程度是一致的，但有些酶的释放要慢得多，而另一些酶又比平均蛋白质释放速度快。这些差别还不足以达到显著的纯化作用。这样的速度公式虽可

以用来描述精确规定条件下蛋白质的释放,但它的实用价值却受到限制,并且需要根据经验来决定实验条件。

一般来说,革兰氏阴性细菌要比革兰氏阳性细菌容易破碎 (Charm 和 Matteo, 1971),同时材料所经受的处理条件包括生长条件 (Atkinson, 1973) 和冻融方式等因子都会影响蛋白质释放速度。此外,某些酶的释放速度可能与细胞中的大多数蛋白质释放速度不同。特别是周质酶类较容易释放出来 (Melling 和 Scott, 1972)。近来又发现,用非常温和的匀浆化处理 (3.5 MPa) 可去掉大肠杆菌的表面附属物,而不必破碎细菌。

2.4 分离和纯化

2.4.1 去除核酸

在本章我们把核酸作为杂质对待,并注意在保持酶活性的条件下从提取物中去掉核酸。

剪切力 (Davidson, 1959; Trim, 1959)、高 pH (Ralph 和 Bergquist, 1967)、低离子强度 (Marmur 等, 1963) 以及核酸酶的存在 (Gierer, 1957) 等因素都会导致核酸变性。虽然在核酸纯化过程中应避免这些因素的影响,但对酶的纯化来说,这些因素可能有积极作用。

可以考虑的较好的第二类去核酸技术是与沉淀相关的技术。这类技术是通过核酸分子带负电荷的磷酸残基与沉淀剂的正电荷基团所形成的复合物而起作用的。然后再用离心法除掉生成的复合物。

十六烷基三甲基铵溴

Jones (1953) 记述了运用阳离子去垢剂十六烷基甲基

铵溴 (cetavlon) 沉淀,从结核分枝杆菌、草分枝杆菌和膝黄八叠球菌中分离出细菌核酸的方法。Guerritore 和 Bellelli (1959) 证实水溶液中 RNA 的沉淀是 pH、盐浓度、核酸与十六烷基甲基铵溴之比的函数。他们发现浓度为 500 mg/ml 的核糖核酸水溶液,在 pH 7.0 20℃时,最适的核酸与十六烷基甲基铵溴之比为 1—2。在核酸浓度大于 0.2 mol/L 的情况下,氯化钠、硫酸钠、柠檬酸钠都可提高核酸的溶解度,而甘氨酸、葡萄糖和尿素作用甚微或无作用。在这些盐溶液中, pH 5.0 到 9.0 沉淀作用不受影响。

链霉素硫酸盐

Oxenburgh 和 Snoswell (1965) 开发了用链霉素硫酸盐从细菌提取物中去掉核酸的技术。此法是在使用其他方法碰到困难而设计出来的。曾使用过鱼精蛋白硫酸盐和氯化锰 (Heppel, 1955), 但发现结果难于重复 (Snoswell, 1963), 还会损失大量的蛋白质 (Oxenburgh 和 Snoswell, 1965)。

核酸沉淀取决于盐浓度 (Moskowitz, 1963; Donovic 等, 1948)。因此, Oxenburgh 和 Snoswell (1965) 提出,在加入链霉素之前必须将硫酸铵提取物彻底透析。他们发现沉淀与 pH 及链霉素与蛋白质的比例有关。最适 pH 范围在 6—8, 链霉素与蛋白质的比为 1 时所得结果最佳。以植物乳杆菌提取物为材料,使用 10 mg/ml 的蛋白质溶液,在 pH 7.0, 导电率为 0.38 mS, 链霉素用量为 10% (w/v), 链霉素与蛋白质之比为 1.0 的条件下,只损失 24% 的蛋白质。这足可与其他方法媲美,而且它的重复性好。

使用链霉素除了损失蛋白质外,使用中还有潜在的安全问题。因为链霉素本身有毒性,大量使用会使操作者接触过多。连续使用也会产生抗链霉素细菌,将会使链霉素用于治

疗时遇到麻烦。

聚乙烯亚胺

聚乙烯亚胺是一种分子量约 24000 的长链阳离子多聚体。据报道,它沉淀核酸效率很高(Atkinson 和 Jack, 1973)。细胞破碎后把聚乙烯亚胺加到细胞提取物中,再用离心的方法可同时去掉沉淀下来的核酸和细胞碎片。用合成的 DNA-RNA 混合物做材料,在 pH 7.0, 有 0.02 mol/L NaCl 存在,聚乙烯亚胺浓度为 0.294%, 温度 40℃ 时,可沉淀 89% 的 RNA 和 96% 的 DNA。聚乙烯亚胺的沉淀作用也用来有选择地纯化核酸限制性内切酶 EcoRI (Bingham 等, 1977)。

从大肠杆菌 EM 20031 提取物中除去核酸时,不同物质沉淀核酸的效率按以下次序递减:聚赖氨酸>聚乙烯亚胺>十六烷基甲基铵溴>链霉素硫酸盐>鱼精蛋白硫酸盐>氯化锰。精胺、亚精胺、丁二胺和氯化锰的效力较差,而且会在溶液中残留下 75% 以上的核酸。用鱼精蛋白硫酸盐处理后的溶壁微球菌提取液中,过氧化氢酶活性有损失,而且去 RNA 的效果不佳。与此相反的是,用聚乙烯亚胺处理类似的提取物,可沉淀 90% 的核酸,并回收 70% 的过氧化氢酶和草酰乙酸脱羧酶。

使用聚乙烯亚胺也碰到一些困难。聚乙烯亚胺会沉淀水生栖热菌的一些酶,但可用增加离子强度来解决。嗜热脂肪芽孢杆菌的丙糖磷酸异构酶对核酸有高度的亲和力 (Atkinson 等, 1972), 会与核酸一起沉淀。此外,干酪乳杆菌中的二氢叶酸还原酶会与聚乙烯亚胺形成复合物,使酶失活,但经充分透析可恢复活性。这时聚乙烯亚胺已经透析掉了。Trim (1959), Melling 和 Atkinson (1972) 注意到,用液体剪切法制备细菌提取物时所发生的核酸解聚作用,采用此类制备

法只去掉 85% 的核酸, 而用非剪切法获得提取物时却可去掉 95% 的核酸。使用聚乙烯亚胺所受到的最大限制是它所存在的未反应的单体, 可能会致癌。

核酸酶处理

此法是近年来选用的一种方法。用牛胰核酸酶和脱氧核酸酶水解细菌的核酸是我们所熟悉的 (Davidson, 1965), 并且有报道用脱氧核酸酶处理破碎的细菌悬浮液 (Burgess, 1969; Burgess 等, 1969), 尽管研究得不够详细。

Melling 和 Atkinson (1972) 研究了用核酸酶处理从细菌悬液中去核酸的方法。对于所用的两株大肠杆菌来讲, 核酸酶处理在解聚核酸上是有效的, 离心去掉细胞碎片后提高了上清液回收。然而, 此阶段的核苷酸含量还相当高, 可达蛋白质加上核苷酸总量的 15—20%。这可用硫酸铵沉淀, 接着透析沉淀物而使核苷酸量降到很低的水平。在提取过程中通常要有这一步骤, 说明这是降低核酸杂质的有效手段。

显然, 生物体自身含有的核酸酶提供了一种常常是未识别出的“核酸酶处理”, 如果核酸能有效地去掉, 那么从缺少核糖核酸酶的大肠杆菌菌株 (MRE 600) 所得到的结果, 能够显示出脱氧核糖核酸酶以及核糖核酸酶处理的重要性。

核酸酶处理 5 kg 的细菌体的费用是 1 英镑, 而用链霉素硫酸盐和鱼精蛋白硫酸盐处理的费用分别是 30 英镑和 350 英镑。

2.4.2 用沉淀法浓缩

硫酸铵

蛋白质盐析法已使用了多年, 它可以达到纯化和浓缩特定蛋白质的双重目的。最常用的盐是硫酸铵, 因为它的溶解

度高,对大多数酶无毒,价廉,有时对酶还有稳定效应 (Dixon 和 Webb, 1979)。

Green 和 Hughes (1955), Dixon 和 Webb (1961) 讨论了盐析法进行酶分级分离的理论。在浓电解质溶液中,蛋白质溶解度降低的对数与盐浓度(离子强度)的增加成直线函数关系。描述盐析过程的通式为:

$$\lg s = B^1 - K^1s \frac{\gamma}{2}$$

式中

s = 蛋白质在溶液中的溶解度(以 g/l 表示)

B^1 = 截距常数

K^1s = (直线斜率)盐析常数

γ = 离子强度 (mol/L)

B^1 值取决于使用的盐类,并且会随 pH、温度及溶液中的蛋白质性质不同而改变。另一方面, K^1s 则不依赖于 pH 和温度,但却会因溶液中的蛋白质和使用的盐而变化 (Charm 和 Matteo, 1971)。

已知浓度的蛋白质溶液在下式所给出的离子强度下开始沉淀:

$$\frac{\Gamma}{2} = \frac{B^1 - \lg s}{K^1s}$$

正如 Charm 和 Matteo (1971) 所指出的,只有在 pH、温度、蛋白质浓度保持不变的条件下,才能获得可重复的结果。在上述条件下,沉淀一种酶所需的盐浓度会随酶浓度而变 (Dixon 和 Webb, 1961)。

当改变 pH、温度及电解质类型等参数时,要考虑一些实用的方面。在离子强度不变条件下,如果蛋白质处于等电点的偏酸或偏碱一边时,其溶解度增加。这意味着在保持蛋白

质等电点的情况下，降低离子强度会使蛋白质沉淀。在稀电解质溶液中，蛋白质在 0°C 以上易溶解；但在浓电解质溶液中，这种效应是相反的。因为高价盐产生的离子强度要比低价盐的高，因此高价盐在沉淀蛋白质中更为有效。

许多作者已论述硫酸铵在酶纯化中的应用。从大肠杆菌菌株 W 3310 提取青霉素酶 (Melling 和 Scott, 1972) 是一个相当典型的例子。由于硫酸铵 (20% w/v) 沉淀掉不需要的蛋白质，比活力提高 4 倍，把硫酸铵浓度提高到 56% (w/v)，沉淀出青霉素酶，酶纯化了 5 倍，同时使容积 60 升的样品缩减到重 2.4 kg 的浆状沉淀物。

有机溶剂

把有机溶剂加到蛋白质水溶液中，降低介质的介电常数，使蛋白质的溶解度下降。当逐渐增加有机溶剂的加入量时，蛋白质分子与其他蛋白质分子的相互作用加强，从而减少与水的作用。带相反电荷的蛋白质分子间的络合继续到产生蛋白质沉淀为止。这是由于介电常数下降引起具不同电荷的蛋白质分子间的库仑引力增加的结果 (Green 和 Hughes, 1955)。把盐加到含有机溶剂的水溶液中会增加蛋白质的溶解度。在有机溶剂存在时，温度高于 4°C 会导致蛋白质变性，因此操作温度要在 0°C 以下，这是容易做到的，因为有机溶剂会使冰点下降。

正如 Green 和 Hughes (1955) 指出的，有机溶剂的效应除了改变介电常数以外，还有其他因素的作用。蛋白结合水与有机溶剂分子的交换可引起蛋白质溶剂化，因为所用的有机溶剂必须是与水混溶的，这就说明脱水作用可能导致蛋白质沉淀。但是这些效应是无法预先估计到的，这可能取决于蛋白质的离子化程度。这样，使蛋白质中存在的许多带电

荷基团产生脱水作用,而不是溶剂化作用。

可用各种有机溶剂来沉淀蛋白质。甲醇、乙醇和异丙醇是最主要的,丙酮甚至乙醚也可用来沉淀蛋白质,但它们有易燃的缺点。

至今还未广泛使用有机溶剂来大规模沉淀和浓缩酶。此法沉淀蛋白质的精确度高,但材料的可燃性以及成本较高,使此法的吸引力不大。不过,引人注目的血清蛋白的分级分离却是个例外。虽然在此分离过程中引入过其他技术,但自从 Cohn 等 (1946) 介绍此分离方法以来,乙醇沉淀法一直是最好的,而且已发展成自动化程度高的计算机控制系统 (Foster 和 Watt, 1980)。

高分子量聚合物

其他可作为蛋白质分级分离的有机沉淀剂是水溶性聚合物,其中最广泛使用的是聚乙二醇。它具有无毒、不会燃烧、不使蛋白质变性的优点。Kula 等 (1977) 和 Hao 等 (1980) 描述了它的作用方式 and 应用范围,但除了血液加工领域外,并未广泛使用。

2.4.3 超滤浓缩

在此超滤技术是作为一种浓缩方法,不过它仍然是一种纯化某些蛋白质的有用手段,这是利用蛋白质分子量(大小)的差别来进行分离的。

超滤是过滤技术系列中的一部分,其范围从反渗透(分子量截留到约 250)、超滤(分子量截留在 500—300 000 之间)、微粒过滤直到颗粒过滤,在超滤与微粒过滤范围间有些重叠。

有两种超滤膜,即微孔超滤膜和扩散超滤膜。微孔超滤

膜很类似于传统的滤膜。膜是刚性的，上面有一系列极小的随机分布的、平均大小为 $500-5\,000\text{ \AA}$ 级的“探针”穿透的孔 (Michaels, 1968)。这样，很小的分子会通过膜，而很大的分子则会截留在膜结构中。因为这些膜会截留住中等大小的分子，所以容易阻塞。较小的孔先被阻塞，只留下较大的孔来通过溶质和溶剂，使膜的截留能力及对不同溶质间的区分能力降低。最后，除了非常小的分子外，大多数分子都堵塞，结果变成孔径更小的膜。为了减少堵塞，有人建议选择平均孔大小远低于需截留溶质分子大小的膜。这可以看出微孔膜对于浓缩高分子量溶质 ($<1 \times 10^6$) 是有用的。然而大多数微孔膜已为扩散型的膜所取代，因为扩散型的膜除了能浓缩外，还能更有选择性地区分开分子。

扩散超滤膜是一种均匀的水凝胶膜，溶剂和溶质是在浓度或活性梯度作用下，通过分子扩散进行运送 (Michaels, 1968)。分子的运送需要一定的动能，而且是一种热活化过程。Michaels (1968) 认为所需的能量，除了与扩散分子和膜聚合基质间的相互作用力有关外，主要取决于扩散分子的大小、膜聚合基质的密度以及对基质聚合物片段自由运动的束缚。这样，对于高通透性膜来讲，就需具有水合度高的凝胶基质以及聚合物和溶剂间专一性强的亲和力这两种条件。对于低透性膜其条件正好相反，要降低溶质和聚合物间的亲和力。

Schmidt 在 1861 年首先记载了超滤现象。他用牛心包作为膜，可以部分截留阿拉伯树胶。Martin (1896) 首次制作出了人工膜，并用这种膜来分级分离蛇毒。Bechold (1907) 使用了超滤这个专门名词，并且也使用了平面加固火棉胶膜。1961 年到 1965 年间由于各向异性扩散膜的出现，超滤膜技术取得了突破性的发展 (Leob 等, 1960; Leob, 1961;

Blatt 等, 1965; Michaels, 1965)。由于这些重要发展, 使超滤膜成为大规模分离和纯化酶的一种有用工具。

各向异性膜是由一种高度加固的很薄的“皮”(0.1—5 μm)和作为支持物的支撑在下面的较厚(20 μm —1 mm)的多孔下层结构组成的。因为活性层很薄, 因此具有极高的通透速率, 而支持物的多孔性又使得任何通过膜的分子不被支持物所阻留 (Leob 和 Sourirajan, 1964)。这种按常规概念是无孔的膜, 其优点是膜内不发生堵塞, 因此在恒压下溶剂的通透性不会降低。

溶质在这些膜中透过, 主要受 Fick 扩散定律支配。这样, 溶质的流通量与溶质浓度梯度成比例, 溶质的浓度梯度则是由“浓缩”液和“超滤”液中溶质的浓度所决定的, 与压力无关。这意味着压力增加时溶剂流量增加, 而溶质的流量不变, 因而膜的截留效率得以提高 (Michaels, 1968)。

各种溶质的扩散系数因分子的形状和大小而异, 一般具有与分子直径的平方呈指数变化的倾向。

在较低的压力下, 溶剂的活性几乎与流体静力压成正比。但正如前面提到的, 溶剂的通透性取决于温度, 因为温度影响到溶剂在膜中扩散的活化能。温度也会影响溶剂的流动性, 但不显著。

虽然采用各向异性膜不难得到高的溶剂流量速率, 但是溶剂流动可被浓度极化作用急剧降低 (Leob 和 Sourirajan, 1964)。这是由于在膜表面形成一层排阻的溶质, 从而阻碍溶剂流动。由此层造成的对流动的阻抗会逐渐增高, 直到离开极化层的溶质扩散速率与沉积速率相等为止。浓度极化现象还可说明为何随着膜通透的压力下降溶剂流量常常变得恒定的原因。通过膜的溶剂流量是一种水压活化过程, 而且应随压力的增高而增加, 但是会达到这样一种状态, 即溶质极化层

建立的速率正好使流动受到阻碍,而且进一步加压将不起作用。

超滤装置设计的目标是使极化层保持在最小值。实验室的装置,采用搅拌方式增加溶质从极化层离开的速率来达到。在较大的装置中,采用高流速通过中空通道的方式来减少极化层的形成 (Leob 和 Sourirajan, 1964)。

蛋白质的超滤特征是可变的,这取决于许多因素。一些研究者观察到蛋白质吸附在膜上的现象, Van Oss (1970) 作过有关这方面的综述,并提出应使用高浓度溶质,这样也许是使膜上吸附位点饱和而不致显著影响回收。Melling 和 Westmacott (1972) 研究了大肠杆菌部分纯化的青霉素酶制剂的超滤特征。他使用一种截留分子量 30 000 (各向异性的) 的膜,由于缓冲液的 pH 和盐浓度不同,酶的通透量变化在 1.6% 到 55% 之间。最高通透量是在 pH 5.1—6.2 下,接近酶的等电点,而且这时青霉素酶-蛋白质之间相互作用最小。在 pH 8.0 时,把缓冲液的浓度从 1 mmol/L 提高到 30 mmol/L,通透量可以从 1.6% 增加到 20%,这大概是对青霉素酶-蛋白质相互作用有某种缓冲保护作用。加 EDTA 也提高酶的通透量,而尿素有相反的作用。

盐的浓度、盐的性质、pH 等除影响枯草芽孢杆菌的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的持留外,还影响金黄色葡萄球菌、蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌的 β -内酰胺酶的持留 (Melling, 等; 1973 b, 1978)。 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的情况特别有意思,随 NaCl 浓度增加,细菌细胞释放这种酶的形式可由 NaCl 对超滤膜持留酶的影响反映出来 (Brewer 等, 1973)。如同蛋白质的持留与 pH 和盐浓度相关一样,专一性的蛋白质-蛋白质相互作用可能影响蛋白质的持留。在用分子量 100 000 的截留膜时,延伸因子 Tu 具有 45% 的通透量,但加入能与延

伸因子 Tu 形成复合物的因素 Ts 时, 通透量降到 8% (A. Atkinson、未发表结果)。

通过控制影响蛋白质超滤特性的因素, 可使提纯程度得到明显提高, 例如大肠杆菌青霉素酶的纯度可提高 7 倍 (Melling 和 Westmacott, 1972)。另外, 考虑到这种技术从实验室规模扩大较为容易, 因此, 超滤应为大规模酶浓缩和酶纯化提供了强有力的技术。除了作为浓缩手段的不容置疑的作用外, 从酶的纯化角度来看, 浓缩使用的超滤技术已用于大多数蛋白质的纯化。超滤也可用于快速去除大量低分子量的溶质, 如从蛋白质溶液中去掉乙醇或水, 这种过程称为析滤。在此过程中, 失去的超滤液连续被新鲜缓冲液取代, 使超滤小室保持恒定的溶液容积。经计算, 要除掉 99% 的溶质需要初始溶液容积 $\times 4.6$ 倍的通透量 (Nelsen, 1978)。如有需要, 可用初始浓缩步骤以减少通过的体积。选用适当的超滤装置, 此技术可用于从几毫升到数百或数千升的操作规模。最后需要指出的是, 超滤在酶加工过程中成为适用的方法是由于它具有以下一些特点:

(1) 如果需要的话, 可在低温下操作(在 -5 — $+5^{\circ}\text{C}$ 的冷室温度下超滤, 可避免在较高温度下的失活, 还可减少自降解)。

(2) 不需改变相。

(3) 在低流体静压力下操作。

(4) 温和并且无破坏性。

(5) 不需化学试剂。

(6) 如果需要的话, 可同时浓缩和纯化。

(7) 保持浓缩液的恒定离子强度和 pH, 避免酶的失活。

(8) 经济。

2.4.4 冷冻干燥浓缩

许多作者 (Merryman, 1966; Mackenzie, 1966; Longmore, 1968; Rowe, 1970) 对冷冻干燥过程进行了综述, 这里不拟对其基本过程作详细探讨。

在某些情况下冷冻干燥可用来浓缩蛋白质, 除溶液的盐浓度很低外, 它的使用会因形成低共熔混合物而受到限制, 导致干燥不完全、大量发泡和蛋白质变性。这样的问题可通过仔细控制冷冻物温度, 使温度保持在最低部分低共熔物发生点以下。在开始冷冻干燥过程之前, 降低盐浓度也是很有必要的。

与浓缩蛋白质溶液的其他方法比较, 用冷冻干燥法得到的制品适于贮存或运输。

多种不同类型的蛋白质已被冷冻干燥, 这些制品不发生变性或失活 (Schantz 等, 1972; Melling 和 Scott, 1972)。但是, 出人意料地也发现某些蛋白质发生变性并完全丧失生物活性, 这种情况发生在由亚单位组成的蛋白质。在这方面过氧化氢酶 (Hanfusa, 1969) 和肌球蛋白 (Tanford 和 Iouven, 1962) 的研究提供了有用的信息。Rosenkranz 和 Scholtan (1971) 研究了旋光色散和圆二色性光谱, 发现大肠杆菌天冬酰胺酶的结构在冷冻干燥后发生显著变化。Marlborough 等 (1975) 和 Hellman 等 (1983) 发现胡萝卜欧氏杆菌天冬酰胺酶在冷冻干燥 (与冻融相反) 后, 酶分子的三级和四级结构被扰乱, 结果削弱了亚单位间的相互作用。但是把这种冷冻干燥产物重新放在 pH 5.0—7.0 的缓冲液中, 这些结构的扰乱得到恢复。如果使用的缓冲液 pH 值超过这种限度, 会导致酶失活和变性。

看来, 酶的冷冻干燥不但应仔细控制, 而且需对每种酶的

冷干过程作较详细的研究。这些要求对临床用的材料来讲尤其重要。

2.4.5 凝胶层析

这部分也强调技术在制备上的应用，并不侧重在分析上的使用。对凝胶层析技术感兴趣的原因是它能够分级分离和纯化酶类。因此要考虑凝胶的全部结构，并阐明按分子大小和形状分离生物活性化合物的一般理论。

正如 Ackers (1970) 指出的,由于这个题目使用的名称多而出现混乱,把这些名称列出来也许是有用的:

- (1) 凝胶过滤 (Porath 和 Flodin, 1959)。
- (2) 分子筛过滤 (Fasold 等, 1961)。
- (3) 分子筛层析 (Hjerten 和 Mosbach, 1962)。
- (4) 排阻层析 (Pederson, 1962)。
- (5) 限制扩散层析 (Steers 和 Ackers, 1962)。
- (6) 凝胶渗透层析 (Moore, 1964)。
- (7) 凝胶层析 (Determann, 1964)。
- (8) 空间层析 (Haller, 1968)。

Ackers (1970) 从简便和贴切出发,选用了“凝胶层析”这个标题,在本部分也采用这个标题。如果读者要详细了解这一领域,可参阅 Ackers (1970) 的文章,从中还可找到一些有用的参考文献。

Wheaton 和 Baumann(1953) 及以后 Lathe 和 Ruthven (1965) 所作的观察提出了凝胶层析的原理。1959 年 Porath 和 Flodiu 采用交联葡聚糖在层析过程中分离出蛋白质。由于市场需求促使 Sephadex (瑞典,乌普萨拉,Pharmacia 公司)凝胶系列产品及其他一些产品得到了发展。

凝胶层析的原理可以用 3-氯-1,2-环氧丙烷交联的

Sephadex 凝胶来具体说明。所用的葡聚糖是一种可溶性的葡萄糖基多糖,是由肠膜明串珠菌产生的微生物产物。葡萄糖残基主要以 α -1-6 糖苷键联结,葡聚糖链是通过葡萄糖的羟基进行交联的,形成甘油醚键 (Ackers, 1970)。交联程度受所用的 3-氯-1,2-环氧丙烷含量控制,从而决定了凝胶基质内的水合(复得水)程度及与凝胶的孔隙度。每单位干重凝胶复得的水越多,它所能分级分离的分子越大。反之,增加每单位干重凝胶中葡聚糖基质的含量可分级分离的分子越小。这样,若将高分子量和低分子量的混合物上样到得水值低的凝胶(即高度交联的)柱的顶部,高分子量的物质就在流动相中向下流过凝胶柱而首先被收集。低分子量的物质由于通过凝胶内部的固定相而受到延缓。

凝胶层析过程是溶质分子在流动的溶剂相和多孔胶粒构成的固定相的内部空隙间进行扩散分配的过程 (Ackers, 1970)。把凝胶看作多孔珠状结构就可以更容易地理解凝胶层析的机理。流动相是凝胶颗粒外的液体,通称外水体积 (V_o),而固定相是占有凝胶颗粒内的液体 (V_i)。固定相和流动相之间发生溶质扩散交换。在总柱容积 (V_t) 中还包括凝胶基质所占有的容积 (V_g)。因此

$$V_t = V_o + V_i + V_g$$

以 Sephadex G 75 为例,此材料的分级分离的分子量范围在 3 000—80 000 之间,并且在不同程度上受 V_o 和 V_i 之间扩散分配的影响。在此范围内的分子会按它们的分子量、形状和大小进行分级分离,使每种分子都有自己的分配系数。此参数代表着某种分子渗入固定相的程度。Ackers (1970) 发表了分配系数的数学计算方法,而分配系数 K_{av} 可简单地从下面公式得出:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_i - V_o)$$

V_e = 从柱上洗脱下溶质所需溶剂的体积

V_o = 外水体积

V_t = 柱床的总体积

经验表明, K_{av} 值与分子量的对数成反比例 (Andrews, 1970; Brewer, 1971)。图 2.1 说明了在 Sephadex G 75 上球蛋白分子量与 K_{av} 的相互关系。从曲线可见凝胶层析的三种变化, A 到 B 为脱盐, B 到 C 为分子分级分离, C 到 D 为排阻。

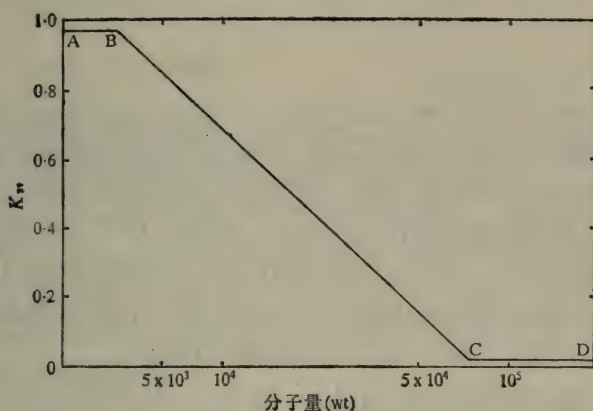


图 2.1 球蛋白的 K_{av} 和分子量的相互关系 (Brewer, 1971)。经 Process Biochemistry 同意。

我们已简要地解释了凝胶层析机理。应特别提到的是, 关于凝胶层析有 4 种基本理论 (Laurent 等, 1969), (1) 排阻理论, (2) 限制扩散理论, (3) 由分子表面力形成的分配, (4) 由凝胶内渗透压形成的分配。至今还未出现一种统一的理论。

近年来, 除交联葡聚糖外, 已有许多种材料用作凝胶层析的基质。它们包括聚丙烯酰胺、琼脂糖、聚苯乙烯、交联琼脂

糖、琼脂糖-聚丙烯酰胺混合物、多孔玻璃和聚甲基丙烯酸甲酯等。这些材料多数具有胜过一般凝胶的明显优点，特别在层析分离扩大上表现的优点更显著。具体地说，颗粒要坚硬得多，而且颗粒较小，大小均匀，使分辨力和流速得到改善。

2.4.6 离子交换层析

可采用的离子交换剂有三种类型：离子交换树脂、离子交换纤维素以及离子交换葡聚糖凝胶和离子交换琼脂糖胶。后两种类型有十分广泛的应用，而离子交换树脂的使用范围有限。

离子交换树脂

通常可把离子交换树脂描述为含有阴离子基团或阳离子基团的不溶于水的聚合物。功能基团的性质有所不同，但都可用以下这些通式表示：阳离子交换树脂 RH^+ 和阴离子交换树脂 ROH^- ，其中R代表树脂聚合物。由于树脂上 H^+ 或 OH^- 与结合在弱碱或弱酸分子（这里指蛋白质）上的离子进行交换，使蛋白质分子能可逆地附着在树脂上。

阳离子交换的功能基团有 $-\text{SO}_3\text{H}$ ， $-\text{COOH}$ ， $-\text{OH}$ ，其酸性依此顺序递减，而阴离子交换剂常含季铵基团 $-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$ （或其他阴离子）。

树脂具有下面一些优点，即对物理应力稳定、蛋白质吸附容量高，沉降迅速，填充入柱后允许高液流速率。这些材料的高容量（可达 5 meq/g ）在用于蛋白质纯化时却往往是缺点，因为蛋白质可能经受不住从树脂上洗脱下来所必需的激烈条件。

虽说如此，离子交换树脂已成功地用于某些蛋白质的纯化（Yamanaka 和 Okunuki, 1963; Richardson 等, 1971）。

离子交换纤维素

通过各种化学加工,可把许多种带电荷的基团(阴离子或阳离子的)引入到纤维素中(Peterson, 1970)。但取代的水平一般是很低的,而且离子交换纤维素的容量(表 2.1)约为树脂交换容量的十分之一。这样就可以在温和条件下洗脱聚电解质。此外,取代高于 1 meq/g 会导致纤维素的增溶溶解,显然这是不希望发生的。表 2.1 列出一些可采用的纤维素类型以及它们的特性。

其他离子交换凝胶

纤维素是蛋白质离子交换层析的传统介质。近来又推出了不少其他离子交换材料,一般说这些材料装入柱后均具有优良的流速。离子交换 Sephadex 凝胶是在 Sephadex G 25 或 G 50 上引入 DEAE 或 CM 基团(Pharmacia 公司)制备成的。那些基于 Sephadex G 50 的离子交换凝胶具有高蛋白容量,但遗憾的是它们较软,而且在缓冲液 pH 或离子强度改变时会收缩或膨胀。

把 DEAE 或 CM 基团引入交联琼脂糖或丙烯酸共聚物可得离子交换 Sepharose(Pharmacia 公司)和 Trisacryl(LKB 公司)。这两种类型的离子交换剂具有高蛋白容量,是由一小而均匀的能确保高流过速率的珠形颗粒组成。它们在一般层析压力下不变形,更重要的是缓冲液 pH 或离子强度改变时不会收缩或膨胀。因为它们在极端 pH 下都不致收缩或膨胀,因此可在柱中再生,在大规模操作中这是很主要的优点。这类离子交换剂的另一优点是用它们纯化医疗用产物时可反复灭菌。

这些材料的主要缺点之一是价格高,与纤维素之类较传

表 2.1 各种纤维素离子交换剂的特性 (Peterson, 1970)

(经北荷兰出版公司准许复制)

类 型	解 离 基 团	交换当量 (meq/g)
阴离子交换剂		
AE-纤维素	氨乙基 $-\text{OCH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	0.3—1.0
DEAE-纤维素	二乙基氨乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	0.1—1.1
TEAE-纤维素	三乙基氨乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	0.5—1.0
GE-纤维素	胍乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$	0.2—0.5
PAB-纤维素	对氨基苄基 $-\text{O}-\text{CH}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{NH}_2$	
ECTEOA 纤维素	三乙醇胺经甘油和聚甘油基链偶联到纤维素上,混合的基团	0.1—0.5
BD-纤维素	苯甲酰化 DEAE-纤维素	0.8
BND-纤维素	苯甲酰化-萘甲酰化 DEAE 纤维素	0.8
PEI-纤维素	聚乙撑亚胺吸附到纤维素或弱磷酸化纤维素上	0.1
阳离子交换剂		
CM-纤维素	羧甲基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	0.5—1.0
P-纤维素	磷酸基 $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$	0.7—7.4
SE-纤维素	磺乙基 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	0.2—0.3

统使用的材料相比,更显得昂贵。但在多数情况下,较高的流速意味着额外的成本可从增加生产能力中收回来。

离子交换层析可根据每种聚电解质所带的电荷,从聚电解质混合物中,把各组分区分出来。因此,溶液的 pH 和离子

强度,以及蛋白质的净电荷、电荷密度、分子大小等都是影响此层析过程的参数。分配系数反映出平衡状态时溶剂中某特定的电解质分子数与附着到固定相的电解质分子数的相关性。因而一种聚电解质样品中受到平衡的分子数目越多,它的分辨率就越高。分离效率也与离子交换剂的容量有关,容量越大,平衡的分子数目就越多,也就减少了分离不同电解质所需的分配系数的差别。

大规模分离酶时,常把柱层析留作为纯化的最终阶段,这是由于在开始阶段必须对大体积量材料进行处理。然而,采用“批式”技术时,在酶分离的早期即可相当不错地使用离子交换剂。这包括把聚电解质结合到离子交换剂上,这样在额定时间内,聚电解质的大部分总是与基质结合的,这样可把聚电解质看作是固定化的。在形成的静电力强的时候,可以得出固定化作用通常所需的条件。这需要聚电解质具有高电荷,而且与离子交换剂的电荷相反。在一般情况下,碱性聚电解质(等电点在 $\text{pH } 7.0$ 以上)在 pH 低于等电点时,被阳离子交换剂吸附(如 CM-纤维素),酸性聚电解质(等电点在 $\text{pH } 7.0$ 以下)在 pH 高于等电点时被吸附到阴离子交换剂(如 DEAE-纤维素)上。因此,了解特定聚电解质的等电点是重要的。在选好离子交换剂后, pH 和离子强度是最重要的。 pH 的选择必须足以使离子交换剂和聚电解质得到高电荷,而离子强度的选用应该有助于保护酶的活性和有利于酶溶解,但不要高到与酶竞争离子交换剂的程度。如果能正确选择条件,就能够把酶吸附到离子交换剂上,再用缓冲液洗去所有未吸附的蛋白质,然后再从离子交换剂上把酶洗脱下来。

常用的洗脱方法有改变 pH 、增加离子强度或两者的结合。把吸附上碱性酶的阳离子交换剂悬浮物的 pH 从酸性变到碱性,离子交换剂和酶的电荷都减少,这样静电键断开,酶

就释放出来。离子强度增加时,对离子交换剂上酶占据的位点的竞争增强,直到酶解吸下来。酶对离子强度的改变和 pH 的改变特别敏感时,把这两个过程结合进行是很有效的。几种聚电解质吸附在同一离子交换剂上时,用分级解吸是有好处的。常可用 pH 和离子强度同时改变来加以控制。一般说,等电点偏离中性远的酶,采用“批式”离子交换层析法比较容易纯化。用 CM-纤维素批式法可将等电点为 8.6 的 L-天冬酰胺酶纯化 100 倍 (Wade, 1968)。

批式技术在去掉核酸之类的杂质聚电解质方面也是有用的。蛋白质纯度的提高可能是不够的,要去掉这些大而且带高电荷的聚电解质常需借助于以后的纯化步骤。

批式吸附接着就洗脱看来是粗放的,而且没有充分利用离子交换技术的分级分离潜力,然而已证实在应用较复杂的方法之前,它是同时完成纯化和浓缩的一种十分有用的技术。

2.4.7 亲和层析

亲和层析也许是能最出色地从复杂混和物中纯化单一蛋白质这一难题的方法,但这种常用于实验室规模的亲和层析法,却在大规模纯化蛋白质中用得极少。

亲和层析依赖于一种蛋白质与一种固定化配体的专一性相互作用。这样的配体主要有两群:

(a) 对所需蛋白质特异的配体。这种配体通常是抗体、底物、底物类似物或者抑制剂。

(b) 可与各种蛋白质相互作用的配体。这样的配体对于不同类的酶特异,如 5'AMP, 2',5' ADP 或 NAD^+ , 或者它们可与多种蛋白质相互作用,如烃链或染料。

不管相互作用的性质如何,重要的是这种作用都是可逆

的。可选用多种去垢剂把蛋白质从亲和配体上解吸下来，其范围包括增加离子强度或改变 pH 之类的非专一性方法和使用辅因子或游离配体的专一性方法。

配体结合的基质应具有以下基本特性：

(a) 通常与蛋白质的反应性弱，以避免非专一性吸附。

(b) 偶联上配体后要具有良好的溶剂流速。

(c) 含有可修饰的化学基团而不致使基质受到损害。

(d) 这些化学基团应当丰富，偶联后具有高容量。

(e) 在偶联和洗脱的各种条件下，必须是机械和化学稳定的。

(f) 具有疏松的孔和亲水的网络结构，可使大分子自由通过，最好是大小均匀、球形、刚性的。

关于不同基质对亲和和层析的影响已进行了大量研究工作（例如 Turkova, 1978; Lowe, 1979; Scouten, 1980）。目前最常使用的基质是球形的 4% 琼脂糖，它可满足大部分需要达到的标准，而且使用方便。

偶联技术

最常使用的偶联方法是在碱性条件下用溴化氰活化（Porath 等, 1967; Axen 等, 1967）生成一种有反应性的亚氨碳酸酯，接着与配体上的亲核部分发生反应。Kohn 和 Wilchek (1981, 1982) 对溴化氰活化过程的化学和定量进行了详细研究。

双环氧乙烷（双环氧化物），如 1, 4-双-(2, 3 环氧丙基) 丁烷与基质和配体间不同长度的亲水臂基形成醚键（Sundberg 和 Porath, 1974）。它们可用来偶联含有羟基、氨基或巯基的配体。已提到的其他偶联试剂还有甲苯-对-磺酰氯或 2, 2, 2 三氟乙烷磺酰氯（Nilsson 和 Mosbach, 1980。

1981),它们能在基质和含胺基的配体间形成稳定的连接。羧基试剂,如 1,1'-羧基二咪唑或 1,1'-羧基一二-1,2,4-三唑也能用来快速偶联不稳定的含胺基配体 (Bethel 等, 1981)。

尽管可以选用多种其他偶联试剂,而溴化氰又具毒性,但溴化氰法仍是使用最广泛的方法。因为此法比较简单而且有良好的偶联产率。溴化氰技术也可把疏水臂基团引入基质,方法是把 1, 6-二氨基乙烷或 6-氨基乙酸偶联到溴化氰活化的基质中。

这些偶联技术也可用来把辅因子或底物之类的小分子或者抗体那样的大分子偶联到固体支持物上。

蛋白质吸附到亲和基质上和从亲和基质上洗脱下来所必需的条件变化很大,这方面已经有详尽的综述(如 Lowe, 1979; Scouten, 1980)。

一般说,吸附作用通常发生在低离子强度和中性 pH 条件下。非专一洗脱会受 pH、离子强度或温度等变化的影响。通常,较高纯化程度比较高的生物专一性洗脱,会受到底物或底物类似物的影响。

虽然有关亲和层析的文献数量很多,而且它对酶的纯化效果是不容置疑的,但是大规模纯化应用的报道却极少。Scawen 等 (1980), Janson 和 Hedman (1982) 报道了大规模亲和层析纯化酶的有关细节。此法不为人们接受的主要原因也许是由于基质昂贵,许多生物配体不稳定,把它们偶联到基质上涉及复杂的化学反应,以及许多这样的配体容量低等。尽管如此,在某些情况下,亲和层析可得到极好的结果。Robinson 等 (1974) 描述了用固定化对-氨基苯- β -吡喃半乳糖苷作配体,大规模自动化纯化大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的方法。

采用固定化活性染料方法发展起来的染料亲和层析可以

避免上述亲和层析的缺陷。Dean 和 Watson (1979), Lowe 等 (1980, 1982), Akinson 等 (1982), Kopperschlager 等 (1982) 对这些染料的使用作了评述。染料亲和层析近来已用于大规模纯化各种各样的酶, 如马肝醇脱氢酶 (Royl 和 Mi-shikawa, 1979), 猪肝蛋白激酶 (Baydoun 等, 1982), 脂肪嗜热芽孢杆菌的甘油激酶 (Scawen 等, 1983)。

染料起假亲和配体的作用, 且经常以令人惊异的专一程度结合上各种各样的蛋白质。结合上的蛋白质可用提高离子强度非专一性洗脱, 或用底物、辅因子等生物专一性方法洗脱。

从实用观点看, 活性染料有许多优点。它们可大量购得, 购来后即可使用, 价格便宜, 而且可以在微碱性条件下不用有毒的化学试剂即可偶联到载体上。一旦偶联成功, 生成的键稳定而且结合容量高。染料配体对细菌苹果酸脱氢酶的容量比用核苷酸配体对这种酶的容量要高约 20 倍 (Scawen 等, 1982)。

2.4.8 非专一性吸附

羟基磷灰石

羟基磷灰石 (HA) 在批式技术中用来纯化酶已使用了相当长的时期 (Levin, 1959)。Swingle 和 Tiselius (1951) 建立了使用 HA 的柱层析。但是蛋白质化学家对这种方法的接受却显得缓慢。Bernardi (1971) 对出现这种情况的原因做了如下归纳。

(a) HA 的制备过程繁琐。

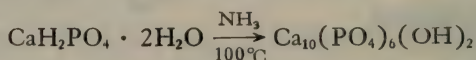
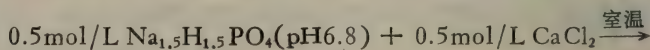
(b) 蛋白质和 HA 相互作用的机理不清。

(c) Peterson 和 Sober 在 1956 年使用了纤维素离子交换剂。

许多作者已介绍了实验室规模结晶羟基磷灰石的制备方法 (Tiselius 等, 1956; Main 等, 1959; Bernardi, 1971)。Atkinson 等 (1973) 发表了一种便宜而简单的大规模生产 HA 的方法, HA 结晶大小均匀, 有良好的流速和蛋白结合容量。这些作者批评工业化生产的 HA 价格高, 而且结晶结构、流速和结合容量等常靠不住。

Bernardi 和 Kawasaki (1968) 描述了蛋白质和 HA 相互作用的机理, 其中包括蛋白质二级结构和三级结构对层析行为的影响。Kawasaki 和 Bernardi (1970a, b), Kawasaki (1970 a, b) 研究了决定 HA 柱分辨率的参数以及结构刚性大分子层析的理论基础。Bernardi (1971) 认为 HA 层析是蛋白质纯化的另一种方法, 因为它与离子交换和凝胶过滤法的分离依据都不同。

羟基磷灰石的制备 (Atkinson 等, 1973) 是基于在碱性条件下沸腾转化次磷酸钙 (brushite)。



次磷酸钙

羟基磷灰石

羟基磷灰石分离大分子的机理还不完全清楚。但一般认为, HA 结晶表面外露的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 参与大分子的分级分离。可认为酸性和中性蛋白质与 HA 上的 Ca^{2+} 位点结合; 高浓度 NaCl、KCl 或 CaCl_2 的存在既不影响两者结合, 也不影响洗脱 (Bernardi, 1971; Bernardi 等, 1972)。酸性和中性蛋白质的洗脱一般是用 pH 约 6.8 低浓度的磷酸缓冲液 (30—120 mmol/L)。碱性蛋白质是结合在 HA 结晶的 PO_4^{3-} 基团上, NaCl、KCl 和 CaCl_2 的存在会强烈影响吸附和洗脱。一般可用这些盐和浓度 120—230 mmol/L 的磷酸

缓冲液进行洗脱,但仍有不少例外。磷蛋白一般需要用高浓度磷酸盐洗脱 (Bernardi 等, 1972), 而某些碱性蛋白质甚至用浓度很高的 CaCl_2 也洗脱不下来 (Bernardi 等, 1972)。Bernardi (1971) 也指出,在 pH 6.8 时碱性蛋白结合牢固,而碱性氨基酸结合试验却要在 pH 7.5 的条件下进行。Atkinson 等 (1973) 指出了能结合磷酸基团的酸性蛋白质具有出乎意料的洗脱特性,例如脂肪嗜热芽孢杆菌和大肠杆菌的色氨酰-tRNA 合成酶。这些不含磷酸基团的酸性蛋白酶在 1.0 mol/L 的 NaCl 溶液中可吸附到 HA 上,而且需要 400 mmol/L 的磷酸盐。在 pH 6.8 洗脱,这几乎相当于碱性很强的蛋白质所要求的洗脱条件。也有人注意到酶结合的辅因子能够改变 HA 柱上二氢叶酸还原酶的洗脱曲线。

用 HA 进行酶的大规模分离和纯化可得到良好效果,这是蛋白质化学家可采用的。用 16 升的 HA 柱,从上样的脂肪嗜热芽孢杆菌抽提出的 500 g 蛋白质中成功地分离出 6 种酶: 丙糖磷酸异构酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、NADH 脱氢酶、缬氨酰-tRNA 合成酶、蛋氨酰-tRNA 合成酶、色氨酰-tRNA 合成酶。此外,还把从 20 kg 大肠杆菌 EM 20031 所得的蛋氨酰-tRNA 合成酶 (3.6×10^6 单位) 也在 HA 上进行了分级分离。产率为 85%, 纯度提高 12 倍 (Bruton 等, 1975)。脂肪嗜热芽孢杆菌的缬氨酸-tRNA 合成酶、酪氨酰-tRNA 合成酶、硫氢酸酶也可用 HA 层析进行分离 (Atkinson 等, 1979)。

塞里硅藻土 (Celite)

塞里硅藻土是一种主要由碳酸钙和一些硅酸盐构成的硅藻土。此材料已成功地用于纯化蜡状芽孢杆菌的两种 β -内酰胺酶 (Davies 等, 1974)。在 pH 7.0, 培养上清液中的酶

直接被硅藻土吸附,并在同样 pH 下用高离子强度的 Tris- 锌-柠檬酸盐-NaCl 缓冲液洗脱。虽说以前使用过塞里硅藻土和玻璃粉 (Miller 等, 1965; Kuwabarra, 1970), 但这些作者只收回 β -内酰胺酶 I, 也许是由于吸附时用了低 pH (pH 4.5), 洗脱时用了较高的 pH (8.5) 的缘故。虽然还不清楚塞里硅藻土是否能用于其他酶, 但仅从使青霉素酶纯化 20 倍这一点就可想到, 这样一种便宜而且易得的材料是会得到进一步研究的。

2.4.9 疏水相互作用层析

疏水层析是在观察到某些蛋白质出人意料地保留在含有疏水间隔臂的亲凝胶上的现象以后发展起来的 (Er-el 等, 1972; Shaltiel 和 Er-el, 1973)。这种想法得到进一步扩展, 并用同系的不同链长的烃制备出各种疏水吸附剂 (Shaltiel, 1974)。在实际使用中, 大多数蛋白质可用 C-8 或苯基取代物进行纯化, 结果令人满意。

疏水相互作用在高离子强度时最强, 所以在盐沉淀或离子交换层析步骤后很易吸附到疏水基质上。然后改变溶剂的离子强度、pH 或离子组成以及使用乙二醇等介电常数修饰剂进行有效的洗脱。

不同种类的盐在促进疏水相互作用的效能上是不同的, 阴离子和阳离子均可排进疏水溶剂的系列中, 但取决于它们到底是促进疏水相互作用 (盐析效应), 还是破坏水的结构 [促溶 (Chaotropic) 效应], 而导致削弱疏水相互作用 (Hjerten 等, 1974) (见表 2.2)。

2.4.10 高效液相层析 (HPLC)

近年来层析方法中最重要的进展之一是引入了高效液相

表 2.2 离子对疏水相互作用的影响

	增加盐析效应
阳离子	NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}
阴离子	PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^-
	增加促溶效应

层析。最初此技术是用来分离溶于非水溶剂中的小分子有机物,后来很快发展成适用于分离较大的水溶性生物化合物。近年来,随着大孔载体的出现,此项技术已发展成适用于蛋白质和核酸那样的大分子 (Hancock 和 Sparrow, 1983; Hearn, 1982; Scoble 和 Brown, 1983)。

高效液相层析柱的高效率来自小颗粒载体,其直径为 5—10 μm ,只相当于经典的软性凝胶直径的十分之一。为了达到所需的流速,小颗粒必须承受高压,这样颗粒必须非常坚硬。最初使用的载体是硅胶,但硅胶颗粒的表面对于蛋白质是有害的。然而可通过与单氯硅烷或单烷氧基硅烷反应衍生出对蛋白质吸引力更强的亲水表面。近年来已经对表面修饰的硅胶载体的化学作了全面的综述 (如 Majors, 1981; Unger, 1978)。

硅胶的主要缺点是在 pH 7.8 以上不稳定,这促使 pH 稳定范围大得多的刚性聚合载体的发展 (如 Pharmacia 公司的 Mono Q; Toyo Soda 有限公司的 TSK-PW)。事实证明这些载体特别适用于高效离子交换层析。

所有的常规层析技术(凝胶过滤、离子交换、疏水层析、亲和层析)都可在 HPLC 中应用 (Regnier 和 Gooding, 1980; Regnier, 1982; Pearson 等, 1982; Larsson 等, 1983)。至今描述的用于蛋白质纯化的 HPLC 都限于小规模操作。现已用高效离子交换层析分离和纯化微克量的血管紧张肽

(Dizdaroglu 等, 1982), 甚至从牛乳中用逆相层析分离和纯化纳克量的促黄体生成激素释放激素 (Amarant 等, 1982)。还用高效离子交换层析分离出毫克量的脑己糖激酶 (Polakis 和 Wilson, 1982), 还有用高效液相亲和层析以毫克规模纯化了乳酸脱氢酶 (Small 等, 1983)。可见 HPLC 的规模有相当大的扩大潜力, 因为除了使用较大的层析柱外, 此技术容易进行自动化, 可以使样品反复多次注到同一层析柱上。

2.4.11 电泳技术

电泳

近年来, 对电泳的基本概念和理论已作了重新估价 (例如, Hjelmeland 和 Chrambach, 1981, 1982; Rosenfeld, 1982)。

不管采用什么形式的专门技术, 电泳的原理是相同的, 可简单地定义为带电荷颗粒在电场中的加速运动。由于通过周围介质时受到相反方向的摩擦力, 使这些颗粒的运动是等速的, 并且速度与它们的电荷成比例, 阳离子向阴极移动, 阴离子向阳极移动。通过溶液的电流符合欧姆定律: $V = R \times I$, 其中 V = 电压, R = 电阻, I = 电流。实际上, 电流增加受到渐增的电压的影响, 因为离子携带着电流, 离子的迁移会随电流的增加而增加。

离子迁移速率可表示为 $Q \times N$, 其中 Q = 电场强度, N = 离子具有的净电荷。迁移速率受到离子通过溶液所遇到的摩擦力的阻抗。据斯托克斯定律, 半径 a 的球形颗粒, 在粘度系数 η 的介质中以速度 V 移动中, 会受到摩擦力 F 的影响, 这样

$$F = 6\pi\eta aV$$

可见 F 随 η 的改变而变化, 而 η 的改变受温度变化的影响。这

样,离子的迁移速率,不仅随所用的电流、分子的大小和形状的改变而变化,还会随温度而变化。但这并不意味着同样迁移速率的分子是同一种分子。

当电流通过一定大小的单位体积时,依照以下通式计算产生的热量:

$$w = \frac{x E^2}{A}$$

w = 产生的热

x = 电导率

E = 电场强度

A = 机械热当量

产生的热(取决于所用电压)对分析和制备技术都会造成许多不良影响:

- (a) 密度改变,产生对流电流。
- (b) 降低粘度,导致扩散增加,影响分辨率。
- (c) 增加电导率,可使用稳流电源加以解决。
- (d) 可挥发成分蒸发,引起 pH、离子强度和电导率的改变。蒸发也可造成电极槽的水流失,导致缓冲液的盐积聚在电场中心附近(只在用某种技术时才显著)。
- (e) 使热敏感酶变性。

另一个问题是电渗透现象,它的作用是使水从一个电极转送到另一个电极。这是由支持介质带电荷引起的。在中性和碱性 pH,支持介质带的电荷通常是负的,因而带电的介质试图向阳极移动。与此相平衡的是带正电荷的水分子(H_3O^+)移向阴极。水的这种迁移不影响分级分离容量(Wieme, 1965),但可造成电泳贮液槽中水的损失,这样改变了电泳场的均一性。

通常,高离子强度缓冲液要比低离子强度的缓冲液的迁

移率低。但前者可以产生较为清晰而不连续的带。pH 对电场中酶的迁移有很显著的影响。蛋白质是两性离子,常以三种离子形式存在,存在形式取决于蛋白质等电点 (PI) 和溶液的 pH。蛋白质处于等电点时是电中性的($\text{NH}_3 + \text{RCOO}^-$),在电场中不会迁移。pH 在其等电点的酸性一边,这种蛋白质带正电荷 ($\text{NH}_3 + \text{RCOOH}$),而在碱性溶液中则带负电荷 (NH_2RCOO^-)。

对蛋白质化学家来说,可利用的大规模电泳技术并不多。在大多数情况下,总是避免使用这种技术,因为设备价格昂贵,分级分离需要的时间长,唯一的例外是此法确比其他方法的纯度高。可采用的制备技术中,只有一二种是真正能成为大规模方法的。

可采用的制备电泳技术有数种,这里介绍其中几种。柱聚丙烯酰胺凝胶电泳可分级分离 10 g 蛋白质 (Shaw, 1969),而连续幕 (curtain) 电泳每小时可分离 15—20 mg 蛋白质。强制流动电泳 (forced flow electrophoresis) 已用在纯化和浓缩细菌来源的各种兽医疫苗 (Wieme, 1965),注入容量约为每小时 9 升。此外,Grassman 和 Hanrig (1949) 引入连续区带电泳,Thompson 等 (1980) 建立新改进的 Philpot 连续制备自由电泳技术 (Philpot, 1973)。这种装置的流速为每小时 0.5—1.5 升 (50 mg/ml),可工作一个工作日以上,酶的回收在 80—100% 之间。

等电聚焦

在颗粒凝胶-Sephadex 或琼脂糖床中进行等电聚焦是一种很有吸引力的建议,但在使用较厚的凝胶时会产热,而使蛋白质的上样量限定在 1 g 左右,这样的量不是真正的大规模操作 (Freg 和 Radola, 1982)。

多膜电倾析 (multimembrane electrodecantation)

虽然这种技术很少在实际中使用,但早在 1929 年 Pauli 和 Valko 就观察到电倾析现象,以后 Gutfreund (1943) 用这种技术来分离蛋白质。Polson (1953) 建立了能够作连续或批式分级分离蛋白质混合物的多膜电倾析装置。

此方法是把蛋白质溶液置于内含许多半透膜的槽中。溶液的 pH 调到需纯化蛋白质的等电点。通过两个斜放的电极使电流通过溶液。因为要纯化的蛋白质处于等电点,在电场中仍保持静止,而其他蛋白质带有电荷,会向阴极或阳极移动。当迁移的蛋白质遇到半透膜时就停下来。蛋白质在膜表面积聚使密度增高,这样就会向槽底移动。由倾斜电极产生的温度梯度有助于此倾析过程,这意味着槽底的缓冲液粘度要比槽顶部的大。因此不需要的蛋白质就积聚在槽底,可排放掉,槽中留下所需成分。可再把新鲜缓冲液灌满槽,重复上述过程以达到进一步纯化。在连续过程中,把这样的一些槽串联起来,可减少放出液流中遗留的不移动蛋白质。

使用这项技术,已经分级分离了破伤风毒素 (Largier, 1956)、白喉类毒素 (Largier, 1957)、人血清球蛋白 (Polson, 1953)。Mathies (1952) 用此法将碱性磷酸酶纯化了 3 倍; Polson (1953, 1956) 分级分离了胰蛋白酶和脱氧核糖核酸酶,但是都发现酶活性有较大损失。Fleetwood 和 Milne (1967) 用此技术获得抗体和球蛋白,回收 80%,纯度提高 650 倍。Brummelhuis 和 Krijnen (1970) 从马的抗人淋巴细胞血清制备出一种称为抗淋巴细胞球蛋白 (ALG) 的免疫抑制剂。Winchester 等 (1971) 把此项技术用于牛 1-D-葡萄糖苷酶、乙酰氨基葡萄糖苷酶和细菌蛋白酶的纯化。前两种酶纯化了约 10 倍,用聚丙烯酰胺凝胶电泳验证,表明蛋白

酶是均一的。他们也证实产率可达每小时 0.5—1.0 升的 2% (w/v) 粗酶蛋白。此法唯一的限制是经过一段时间的连续运转后,膜会发生堵塞。

看来多膜电倾析是大规模纯化酶的适宜方法。目前只有较少的人采用这种方法。由于这种方法的理论可行,而且所需的专门技能也较易掌握,因此在大规模分级分离酶的过程中,这种方法会更普遍的为人们所采用。

2.4.12 层析聚焦

作为一种层析技术,层析聚焦实际上是在特定的离子交换树脂床上进行的、用两性缓冲液洗脱的一种等电聚焦 (Sluyterman 和 Wijdenes, 1978; Sluyterman 和 Elgersma, 1978; Sluyterman, 1982)。

层析聚焦能把等电聚焦的高分辨力和层析的简便操作结合起来,这样更适合于大规模操作应用,但至今所描述的应用还只是小规模。层析聚焦已用于分级分离酵母己糖激酶 (Koetzke 和 Entian, 1982),并在 6 mol/L 尿素存在下分级分离牛眼球晶状体晶蛋白 (Bloemendal 和 Groenwoud, 1981)。

2.4.13 含水两相分离

含水两相系统可用聚乙二醇和葡聚糖溶液或者聚乙二醇和某些盐(特别是硫酸铵或磷酸钾)溶液混合而建立起来。蛋白质和细胞碎片在两相间分配。某种特定蛋白质的确切位置取决于下面一些参数;蛋白质的分子量、聚合物的浓度和分子量、混合物的温度、pH 和离子强度以及多价盐的存在等 (Knla, 1979)。不过每一种蛋白质最适分配条件必须凭经验才能找出来。两相系统可有效地从细胞匀浆中除去细胞碎

片,因此也达到某种程度的纯化。

在某些情况下,可在沉降罐中将两相分开,但用离心的办法分离更为有效而且快速。因为分离不同密度的配体常常要比从液体中分离出固体容易,特别在大规模操作中效果更好。因此认为此项技术在大规模酶制备中使用会有很大的优越性(Kroner 等, 1978)。尽管有上述这些明显的优点,可是水溶液相分配却很少为人们使用,这是因为所用的葡聚糖和聚乙二醇不能回收再用,而使成本增高的缘故。近来有报告提到可使用粗制葡聚糖,这样可大大降低制备成本(Kroner 等, 1982)。

两相分离技术已用于从 5 kg 肺炎克雷伯氏菌细胞浆大规模纯化茁霉多糖对-6-葡聚糖水解酶和 1, 4-2-葡聚糖磷酸化酶(Hustedt 等, 1978), 以及从大肠杆菌分离纯化 RNA 聚合酶和谷氨酰胺合成酶(Takahashi 和 Adachi, 1982)。

把一种配体偶联到聚乙二醇上,有可能增加有利于聚乙二醇相的蛋白质分配系数。这样,使用西巴罗蓝(Cibacronblue)染料仅用二步,就能把酵母磷酸果糖激酶纯化 58 倍(Koperschlager 和 Johansson, 1982)。

第3章 工业酶学原理： 可溶性酶和固定化酶在 工业过程中应用的基础

P. S. J. 奇塔姆

符 号 与 术 语

ATP	腺苷三磷酸。腺苷二磷酸为 ADP，腺苷一磷酸为 AMP
NAD ⁺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸，其还原型为 NADH
NADP ⁺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，其还原型为 NADPH
CMP	胞嘧啶核苷一磷酸，胞嘧啶核苷二磷酸为 CDP
CSTR	连续搅拌罐式反应器
PFR	塞流式反应器
ΔG	自由能变化
$\Delta G^\#$	或 E 高能过渡态的自由能(活化能)
ΔH	反应时的焓变化
T	绝对温度
h	普朗克常数
ΔS	反应时熵的变化
R	普通气体常数
mol/L	摩尔浓度
pH	溶液中质子浓度的量度
A	阿雷尼厄斯常数

pO_2	氧分压
Re	雷诺数
V_{\max}	酶催化反应的最大反应速度
V'_{\max}	可逆反应中酶反应最大速度
V''_{\max}	固定化酶反应的最大速度
V_t	保温一段时间(t)以后的反应速度
V_{\max}^s	单位表面积上的最大反应速度
V_{\max}^v	单位体积的载体或细胞的最大反应速度
K_m	米氏常数
K'_m	逆反应酶的米氏常数
K''_m	固定化酶的米氏常数
k	速度常数(使用各种下标)
K	平衡常数
K_s	E-S 复合物的解离常数
$[I]$	抑制剂浓度
K_i	抑制常数
K_{ip}	产物抑制常数
t	酶催化反应时间
$[S]$	底物浓度
$[S_b]$	整体溶液中的底物浓度
$[S_s]$	细胞或酶表面上的底物浓度
$[S_t]$	反应一定时间(t)以后存留的底物浓度
$[S']$	渗透区外的底物浓度
$[S'']$	代谢区内的底物浓度
$[S_{\text{equ}}]$	平衡状态的底物浓度
$[P]$	产物浓度
$[P_{\text{equ}}]$	平衡状态的产物浓度
$[E]$	酶浓度

$[E_0]$	零时的酶浓度
$[E_t]$	反应一段时间(t)后的酶浓度
$[E-S]$	酶-底物复合物浓度
$[E_{inh}]$	在抑制剂存在下所需的酶浓度
kE	反应器内的全部酶量
ν	酶催化反应的初速度
ν'	逆方向的酶反应初速度
ν''	有抑制剂存在时的反应初速度
γ	反应初速度/最大反应速度
σ	底物浓度/ K_m
X	底物转化为产物的程度
η	静态(稳定态)效率因子
η'	操作效率因子
η''	抑制剂存在下得到的效率因子
a_m	单位体积的细胞表面积
K_L	液体质量传递系数
Da	Damköhler 数
D	扩散系数
D_e	有效扩散系数
x	距离
a_m	细胞的外表面积
V_m	细胞体积
a	渗透区的外表面积
a'	单位体积细胞的外表面积
c	浓度
V	速度
Lad_p	颗粒稠度
N_{pe}	皮克里特准数

Ψ	颗粒的孔度
Γ	曲率因子
h_s	外传递系数
μ_s	外扩散系数
ϕ	Thiele 模数
λ	酶活力衰变常数
Q	单位反应物产生的反应热
V	反应器的工作体积
π	存留时间
q	底物进入反应器的容量流速
H	底物在反应器内平均存留时间
D_c	分散系数
Bo	Bodenstein 数
$-P$	反应器生产率
μ	间充速度
$t/2$	酶活力的半衰期
M_i/M_x	达到的生产或转化的波动
l_c	柱高
T_c	时间常数
N_r	使用的反应器数
n	使用酶的半衰期数
Lf	反应器的传递效率/能量散逸
Δf	在任何时间间隔内示踪洗脱的比例
N	多级反应器的级数
EER	过量酶需求
PIRS	反应器尺寸按比例扩大
AP/L	反应器的单位长度压力降
α	连续反应器工作时间与批式反应器工作时间之比

3.1 引 言

打个诙谐的比方,酶就象接生婆,它能促使娇嫩的生物物质从一个准稳定态转入另一准稳定态。更具体的讲,酶是一类大量普遍存在的具有生物催化剂作用的蛋白质分子,它们能催化构成细胞代谢的所有反应。这样它们就为进行复杂的功能,如进行遗传物质合成以及结构高聚物和其他细胞内物质的合成提供了手段,另外也为大规模的传统工业,如啤酒酿造、面包烤制提供了依据。

酶是由 L-氨基酸按一定的顺序连接在一起而组成的,称为一级结构,并以复杂形式卷曲,形成具有活性中心的两性离子结构。活性中心由较少的几个氨基酸构成,它们在结合底物和催化每种酶分子特有的反应上起直接作用。酶的二级结构是呈现出某种完整结构(如 α 螺旋)的肽链部分,而三级结构是指由次级键,如离子键、氢键和疏水键等维系的多肽链的总体盘卷结构。四级结构描述的是某些复杂的胞内酶,它们由若干多肽链通过次级键联结形成多亚单位酶。

有趣的是,对于大规模有效地将酶用在工业、分析或医药方面,并不一定需要知道它们的氨基酸组成和三维结构。已发现的具有不同底物专一性的酶有几千种,并且还有大量的酶等待人们去发现。然而,分离到纯酶和结晶酶的数量极少。这些酶与那些已获得广泛实际应用的酶是不同的。

酶分子的大小差别相当大,例如 RNA 聚合酶的 β -亚单位的分子量为 155 000,而脑酰基磷酸酯酶的分子量仅为 9 000。根据酶催化反应的类型,可把酶分为六类,即氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类和连接酶类。严格讲,2、3 和 6 类都是转移酶类,但它们只转移基团而不改

变反应物的氧化状态。

(1) 氧化还原酶类催化氧化还原反应，包括像 $C-H \rightarrow C-CH$ 的加氧作用，及等当量地脱去或加上氢原子的反应，如 $CH(OH) \rightarrow C=O$ 。

(2) 转移酶类参与像醛基、酮基、酰基、糖基、磷酰基等各种基团从一个分子转移到另一个分子上的反应。

(3) 水解酶类。可水解的基团范围很宽，包括酯、酰胺、肽和其他含有 $C-N$ 的功能团、酸酐、糖苷和另外一些基团。

(4) 裂合酶类催化像 $C=C$ 、 $C=O$ 和 $C=N$ 的双键加成和形成。

(5) 异构酶类。催化各种类型的异构化，包括催化消旋作用。

(6) 连接酶类。这种酶类常称为合成酶类，参与 $C-O$ 、 $C-S$ 和 $C-N$ 键的形成。

每一类酶中又可以再分成亚类，直到用有化学含义的 6 个数字符号鉴定出单个酶为止(详见 Dixon 和 Webb, 1979)。

按照这样的规定有时也会遇到困难，例如，某些有酶活性的蛋白质分子具有一种以上的酶活性，蛋白质一级结构彼此相距甚远的不同活性中心作用于不同的底物。这种现象是在这样的情况下发生的，即当不同底物专一性的两种酶的基因组图谱相近时，它们的 mRNA 分子由于失去插入的核酸而发生融合。从而形成一种单一的多顺反子 mRNA 分子，进而形成单一的多酶活性的蛋白质。鼠伤寒沙门氏菌融合的组氨酸脱氢酶和氨基转移酶就是一个例子 (Yournon 等, 1970)。另一种例外是通过酶与较低分子量的分子结合使酶的底物专一性发生改变出现的，比如哺乳动物的乳糖合成酶是由 N-乙酰半乳糖转移酶与 α 乳清蛋白结合形成的。

能催化相同化学反应但从不同来源提取的酶(即同系酶)

可能在化学结构上是不同的。活性中心临界区域内的三级结构可能很相似,可以结合相同的底物,催化相同的化学反应。然而,酶分子其他部分的一级结构可能不完全相同,因而足以使整个酶分子的三级结构产生细微变化,使催化反应的最适条件有所不同。传统上酶的命名只与它催化的反应有关。 α 淀粉酶催化多聚葡萄糖(如直链淀粉)的D葡萄糖单位间的 α -1,4键水解。但由真菌米曲霉产生的 α 淀粉酶的最适pH为4.7,最适温度为50℃,而由地衣芽孢杆菌产生的 α 淀粉酶最适pH为7.5,最适温度为90℃。

虽然酶分子足够大,可看作非均质催化剂,但是由于它们是可溶的,通常归为均一性催化剂。显然,催化剂颗粒至少比酶大一个数量级的固定化酶,理所当然是属于非均质催化剂。

3.2 酶活性测定

由于许多酶的底物或产物能吸收可见光或非可见光,酶催化的反应可采用分光光度法进行检测。这是最常用和最简便的测定酶的方法,对反应进行直接的连续检测可得到一条完整的反应过程曲线。分光光度测定特别适用于需要烟酰胺类辅酶的酶测定,因为它们的还原型在340 nm下有吸收。

其他的测定方法有:用pH计跟踪反应过程的pH变化;用氧电极检测反应过程中氧的消耗和氧逸出,更普遍的是用压力计测定逸出的气体。在某些情况下,跟踪荧光吸收,可使测定更灵敏。使用快速反应技术,如停流装置可以跟踪酶促反应的初始阶段情况(Gutfreund, 1972)。

酶活性的标准单位是Katal,定义为每秒钟一摩尔底物转化成产物所需要的酶活性量。当酶在工业上使用时,酶活性是在一定条件下以一定的形式表现出来的,而这些条件与

它们的应用非常有关,无论在临床分析和大规模生物化学过程中都要求如此。因此在某些情况下,以加入的单位重量或单位体积的酶所产生的底物溶解度或粘度的变化速度来表示酶活性,要比沿用的表示法,如每秒钟每毫克酶形成的产物的纳摩尔量更为实用。酶在反应器中使用,尤其在批式测定时,底物浓度比较低,或者只测定反应初速度时,要注意批式测定可能会给出不准确的酶的潜在活性。尤其是当底物有抑制作用或产物活化作用时,批式测定所得到的酶活性会低于柱上达到的活性,而当底物有活化作用或产物有抑制作用时,会高于柱上的活性。

3.3 辅 因 子

并不是所有的酶都能单独起作用,许多酶需要有非蛋白质的辅因子存在才能具有催化能力。实际上这些辅因子是辅助底物,因为反应时它们会发生化学转化,这些辅因子包括简单的金属离子或有机分子,并且有时会共价结合到酶分子上。它们必须连续不断地恢复到原来的状态以便催化作用继续下去,这个过程一般称为再生作用。例如四氢叶酸、生物素、氧化型黄素类和磷酸吡哆醛辅酶,在通气水溶液中经水解或氧化可自发进行再生。然而在大多数情况下,ATP、辅酶A、叶酸、 NAD^+ 和 NADP^+ 等,只能通过与细胞色素或酶等高能底物分子的氧化作用直接偶联进行再生。烟酰胺辅酶再生特别困难,因为它在水溶液中会缓慢降解。辅酶一般很贵,只能少量使用,而且反应是专一的,例如磷酸吡哆醛、硫胺素焦磷酸和黄素单核苷酸以及烟酰胺腺嘌呤核苷酸,分别专一地参与氨基、醛基和氢原子的转移。值得注意的新进展是将交联的 NAD 用于需要 NAD 酶类的亲和沉淀。

3.4 酶作为催化剂的显著特点

酶是强有力的催化剂表现在四个方面。首先是酶催化的高效性,按 V_{\max}/K_m 值衡量,酶要比相应的非酶催化反应快 10^3-10^{11} 倍,每分钟每个酶活性中心可有多达 10^6 个底物分子被代谢转变,这个参数被称为酶分子的中心活性。³ 尽管酶催化反应对一些极端条件,如 pH、温度和压力等的适应低得多,但也可达到这样的速度。并且反应是在最廉价、最安全和最丰富的溶剂水中进行的。

其次,催化的反应范围很宽,比化学催化剂能催化的反应多得多。遗传工程酶、酶的类似物或称“合成酶”的问世,例如用固相合成催化剂方法 (merrifield),按一定顺序将氨基进行体外聚合而形成的“合成酶”类,为天然存在的酶催化反应以外的化学反应能以天然酶相仿的速度和相似的温和条件进行专一的催化提供可能性。这样的酶类似物的最好实例是冠醚 (stoddont, 1980)。其他的例子还有,具有高溶菌酶活性的谷氨酸苯丙氨酸共聚物;具有糖苷酶活性的十肽 (Gln-Phe-Ala-Ala-Glu-Glu-Ala-Ala-Ser-Phe); 甲撑咪唑基(催化)和十二烷基(结合)结合到聚甲撑亚胺链上具有芳基硫酸酯酶活性,此外聚乙烯亚胺上结合钬可作为氢化催化剂 (Coleman 和 Royer, 1980)。

第三,按催化的反应类型来看,酶一般具有很高的专一性。只有极少数情况,一种酶以两种不同方式作用它的底物,例如马来酸和异柠檬酸脱氢酶 (EC 1.1.1, 38, 40 和 42) 能催化底物的还原反应,又可催化脱羧反应 (Dixon 和 Webb, 1979)。酶可以专一于底物的结构和所形成产物的结构,这样在存在许多非常类似的化合物反应混合物中,常常只将其中

一种化合物专一地转化为单一的产物。因此产率较高，有污染危险的副产物较少。由于大多数底物分子具有许多不同反应能力的功能基团，因此这样的专一性是很吸引人的。专一性取决于酶与底物的结合能力及可反应基团的配置能力，结果特别有利于特定反应过渡状态的形成。通常底物专一性并不是绝对的，因为酶常以其他化学上相关的非生理底物作为它们的底物，这些非生理底物与酶的活性中心结合，并在转化中保持完整的立体专一性。例如众所周知的葡萄糖氧化酶，是一种广泛应用的酶，但最近 Alberfi 和 Kibanov (1982) 指出，葡萄糖氧化酶也可以催化苯醌转化为氢醌。另外，碱性磷酸酯酶的“逆反应”也可作磷酸化酶使用。一个更好的例子是大规模用在工业上由葡萄糖生产高果糖浆的葡萄糖异构酶，原本是木糖异构酶，它催化形成木酮糖而不是形成果糖 (Budce, 1977)。事实上，大多数工业上重要的酶并不用来作用它们的天然底物。荧光素酶已成功地用在测定由地雷散落的浓度极低的三硝基甲苯 (TNT)，进而可成功地制成检测 TNT 的灵敏的测定装置。还发现了一些能降解 TNT 的新型微生物 (Naumova 等, 1982)。显然，TNT 肯定不是荧光素酶的常见天然存在的底物！事实证明，酶对非生理活性物质的反应能力在污染物的降解上是很重要的，因为酶的底物专一性有时可用诱发突变来改变 (Betz 等, 1974)。专一性不仅包括区域专一性，还包括立体专一性，例如能识别手性碳原子，这是酶活性中心的不对称三维性质的明显表现，这种性质能赋予底物的专一性结合和催化，或使两者同时进行。例如酶总可以区分成对的化学相似取代基，比如 CH_2XY 上的前手性碳原子上的二个氢原子。

第四，酶自然也会受到许多因素的控制，包括比较粗放的控制酶的合成和降解的速度，比较精细的是通过结合使活性

增加或降低的小分子修饰物控制酶的活性。对工业酶用户来说,重要的是要了解由于酶对底物具有高亲和力,特别适于在很低的底物浓度下作催化剂,但通常也不需要许多酶都具有很高的底物专一性,因为许多工艺过程中使用的底物是纯的,仅含有作为底物使用的单一种分子。

3.5 酶的催化作用

酶是具有立体专一性的生物催化剂,它遵循和化学催化剂一样的动力学和热力学规律,即在反应过程中酶改变反应速度,但不改变底物和产物间的最终平衡位点。催化剂的作用是通过改变反应机制产生具有较低自由能的过渡状态;降低常规过渡状态中间物的自由能;或者通过提供降低产物自由能的环境等方式使净 ΔG 降低。

酶反应的时间过程一般可分为三个阶段:第一个阶段持续不到 1 秒钟,这时游离酶浓度急剧下降,大多数酶分子与底物分子结合,并处于动态平衡状态,只要有新鲜的底物分子可利用,这种状态将保持下去。需要指出的是这时的反应速度对于结合底物所需的能量非常敏感,对于两种竞争底物的自由能差仅有 2 kcal/mol 的酶反应,它们的反应速度之间的比可达到 97:3。在第二阶段中,包括酶分子在内的所有反应物都处于动力学平衡状态,并表现出最大活性。因为高浓度的底物意味着酶分子在前一个(或几个)底物分子转化后,立即能快速再形成酶-底物复合物。在反应的第三个阶段,由于底物浓度显著降低,酶催化的反应速度也逐渐降低。在许多工业化的酶反应中这一阶段特别重要。为了能获得最高产率和最大的产物浓度,希望这段反应进行完全,因此,像底物浓度、酶浓度、反应条件等参数之间的相互关系是十分重要。这个阶

段常常占据大部分反应时间,在出现产物抑制时,反应时间更长,尤其是采用高浓度底物,产物抑制更易发生。在底物和产物之间达到动力学平衡时需要足够长的时间,这时的净自由能变化 (ΔG) 为零,即

$$\Delta G_{\text{产物}} - \Delta G_{\text{反应物}} = 0 \quad (3.1)$$

下式表示 ΔG 与反应热的关系

$$\Delta G = \Delta H + T\Delta S \quad (3.2)$$

式中 ΔS 和 ΔH 分别为反应的熵和焓, ΔG 为吉布斯自由能, T 为绝对温度。当反应过程接近平衡时,反应速度与 ΔG 的大小无关。反应速度取决于形成高能过渡态复合物所必需提供的活化能 ΔG^\ddagger (3.1), 即:

$$k \text{ (实例)} = \frac{RT}{nh} e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad (3.3)$$

K 为速度常数, R 为普通气体常数, h 为普朗克常数。因此, 催化剂是通过降低 ΔG^\ddagger , 使反应速度效应激增, 但不影响 ΔG 或最终的反应平衡点。E-S 复合物的形成在许多情况下(如胰凝乳蛋白酶和羧肽酶), 总伴随着熵的减少。但是在其他一些酶(如胃蛋白酶和胰蛋白酶)中却发现了熵的增加, 这大概是由于酶的构象或酶结合水的量发生了重大变化。例如, 与底物结合后使极性发生改变。

酶活性的特征是形成酶-底物复合物以及催化作用的多功能性, 这是由于许多活性基因, 例如羧基、羟基、硫氢基、氨基和咪唑基, 及其他一些配基金属离子等联合发挥作用。每种基团单独存在的作用是很差的, 但由于以下两种原因会有利于这些基团作用的加强, 首先由于酶的活性中心倾向于排斥水而建立起局部疏水环境, 有助于有机反应的发生; 其次是由于酶具有浓集底物分子的能力, 使局部的底物浓度增加, 从而提高了反应速度。

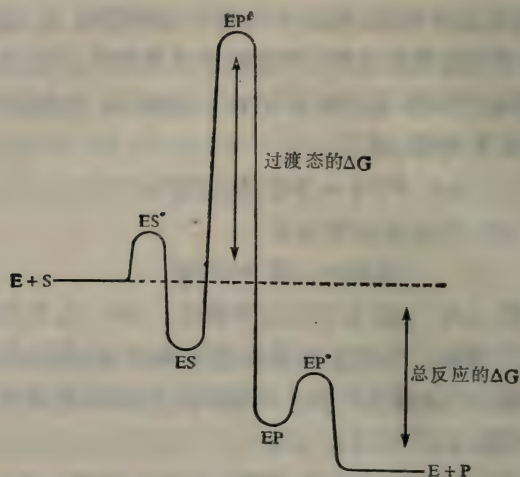


图 3.1 酶-底物复合物形成的酶促反应过程中反应物分子自由能的变化。

研究酶催化作用的困难是反应只发生在酶的活性中心上,虽然酶催化基团和反应物的局部浓度高,但它们只是形成短暂的共价联结并且是同一分子的一部分。

Page 和 Jenckes (1971) 对酶能够达到高反应速度提出了很有价值的解释。他们认为酶发挥这种奇迹般的作用,既不是由于底物和活性中心的催化活性基团间的邻近和定向作用,也不是通常的底物变形,而是因为在游离溶液中两个分子结合形成过渡状态时会失去平移熵和转动熵,使发生的反应变慢。化学的双分子亲核反应就会遇到这种不利因素。这种影响不适用于分子内的过程,因为反应基团已是同一分子的一部分,或者说也不适用于酶催化作用,酶-底物复合物实际上也是单一的整体,因为酶和底物是共价结合在一起的。例如在酶催化的反应中,可能是由于邻近作用,有效底物浓度大约为 10 mol/L 。而在游离溶液中,等摩尔的双分子缩合反应

的有效底物浓度仅有 10^{-7} — 10^{-9} mol/L* 左右。

溶菌酶的作用最能说明酶作用机理 (Blake 等, 1967; Vernon, 1967)。X 射线衍射研究表明,底物的 6 个己糖片段楔合进入酶分子内的长而深的裂隙中,一旦与酶结合,糖环扭曲成半椅(或沙发)型的正碳离子构象。然后反应通过由天冬氨酸 52** 的离子化羧基稳定的正碳离子中间物进行下去。糖环扭曲成半椅型构象有助于醇部分的去除。

酶通常作为带电荷底物的溶剂化外壳,当酶结合底物时,酶发生变形,这样使酶与过渡态互补。由于酶与底物尽可能紧密结合,使过渡态而不是底物受到应力作用,因此参数 k_{cat}/K_m , 即酶与游离底物分子反应的二级反应速度常数达到最大。由于酶与底物只是弱结合, K_m 值高于通常在体内遇到的底物浓度。如果与底物结合很紧密,那么酶-底物复合物就会很稳定,从而使酶的反应能力降低。

因此,使反应速度达到最高的酶,就会有尽可能高的 k_{cat}/K_m 和比较低的 K_m 值。反应速度的上限是受控制碰撞的扩散速度,即 10^8 — 10^9 s⁻¹M⁻¹。例如碳酸酐酶的 k_{cat}/K_m 为 1.2×10^8 s⁻¹M⁻¹, K_m/s 大于 16, 丙糖磷酸异构酶的 k_{cat}/K_m 为 2.4×10^8 , K_m/s 为 150。因此它们不可能成为反应速度更快的催化剂 (Fersht, 1980)。

因此要达到更高的催化效率(高效率是由高 k_{cat}/K_m 比值显示出来的)必须从其他方面进行,比如催化反应的专一性程度。例如在蛋白质合成和 DNA 复制时要求有很高的复制精确度,以便最大限度地增加这个过程的“信号对噪音”的比,因而与氨酰基 tRNA 合成酶有关。此酶除了它的合成酶活性外,还具有水解活性,这种水解活性以高转换数将活化的

* 原文为 10^{-7} — 10^{-9} mol/L。——译者注

** 原文为天冬酰胺 52。——译者注

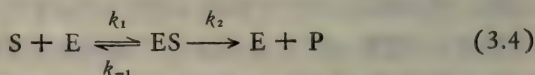
产物脱酰，其速度与攻击所需产物的速度相当 (Fersht 和 Kaethner, 1976)。因此，复制精确度必须远高于简单热力学平衡所允许的精确度，尽管从水解酶活性所释放出的能量来看，其代价是高的。

用化学修饰方法“人为”改进酶方面的工作已取得一些进展。例如将黄素固定在木瓜蛋白酶的活性中心附近，形成具有立体选择性的氧化还原催化剂 (Levine 等, 1977; Slama 等, 1981)。另一个例子是 Wilson 和 Whitesides (1978) 报道的把二磷化铈复合物附着在一种蛋白质上，以利于不对称的氢化作用。这样的人工合成酶可能对某些尚未发现有天然酶催化的反应是很有用的，但还不可能成功地与容易获得的现成天然酶竞争[见 Wiseman (1984) 的综述]。

3.6 酶动力学

酶活性是由下面一些因素决定的，包括酶浓度，底物浓度和其可利用性；辅因子和(或)别构效应物的浓度；抑制剂的存在、类型和浓度；离子强度；pH 和温度。这些因素影响酶活性的方式就是酶动力学研究的内容，它有利于对所研究的反应的理解并可实施控制。

由单一底物 (S) 向单一产物 (P) 的转化，由以下反应通式表示：



当底物浓度远大于酶浓度 (E) 时，对于反应物来说，反应速度表现为零级反应，即反应速度只取决于存在的酶浓度。这样在所有底物接近耗尽之前，反应速度基本保持恒定。当反应速度变成主要取决于底物浓度时，对底物浓度来说为一级

反应。

用众所周知的 Michaelis-Menten 关系式可以很好地描述酶动力学(图 3.2) (Dixon 和 Webb, 1979), 这个方程考虑到了酶-底物复合物的形成。

$$v = \frac{k_2[E][S]}{[S] + K_m} \quad (3.5)$$

式中 $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, 表示达到最大反应速度一半时的底物浓度。即当底物浓度为 K_m 值的 10 倍时, 以 91% 的最大反应速度 (V_{max}) 进行反应, 如果底物浓度为 K_m 值的 100 倍时, 速度为最大反应速度 (V_{max}) 的 99%, 但要求的条件是过量的底物无抑制作用, 酶反应本身不产生抑制剂。在这种情况下,

$$V_{max} = k_2[E] \quad (3.6)$$

Michaelis-Menten 动力学假定底物和酶是可溶性, 能均匀混合, 但在工业生产过程中并不总是如此, 常常使用高浓度高粘度的底物, 甚至有时使用固体底物。在用固体底物的情况下, 底物颗粒占有的表面积往往是比浓度更有用的参数。特别是有些酶(如脂肪酶)似乎是吸附在固体底物颗粒表面上。

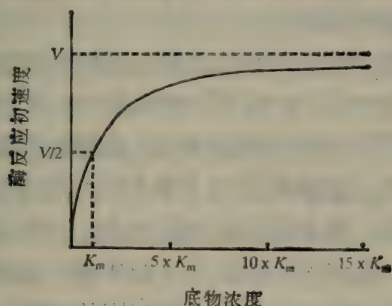


图 3.2 酶反应初速度 (v) 对底物浓度 ($[S]$) 的 Michaelis-Menten 曲线图, 当底物浓度相当于米氏常数 (K_m) 的浓度时, 反应速度为最大反应速度 (V_{max}) 的一半。

根据以下 Michaelis-Menten 方程转换式,可以用图解法推出 V_{\max} 和 K_m 的数值

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (3.7)$$

可用 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图,分别从它与 $1/s$ 和 $1/v$ 轴的截距可以得到 $-1/K_m$ 和 $1/V_{\max}$ 值;直线的斜率为 K_m/V_{\max} 。这个作图法称为 Lineweaver-Burk 作图法。

有时使用 Michaelis-Menten 方程的归一化型式会更方便,即:

$$\gamma = \frac{\sigma}{1 + \sigma} \quad (3.8)$$

式中 $\gamma = v/V_{\max}$, $\sigma = S/K_m$ 。

因此 Lineweaver-Burk 图是由 $1/\gamma$ 对 $1/\sigma$ 作图构成。

在许多情况下,酶-底物复合物解离成游离酶和产物分子的速度相对低,因此限制了酶催化反应速度。当速度常数 k_2 很小, K_m 接近于 k_{-1}/k_1 时,因此 K_m 等于酶-底物复合物 ($[E][S]/[ES]$) 的解离常数 k_s 。在这些条件下, k_2 值决定反应速度,常称作 k_{cat} , 并代表了用底物摩尔数/活性中心/单位时间表示的酶转换数。

酶反应可用下面三个活化的酶-底物复合物很好地描述:

$$E + S \rightleftharpoons EP^* \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons ES^\# \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons EP^* \rightleftharpoons ES \quad (3.9)$$

式中 ES^* 和 EP^* 分别为活化的酶-底物复合物和酶-产物复合物, $ES^\#$ 为过渡态复合物(图 3.1)。应当指出,在物理含义上 Michaelis 复合物不是被活化的,但为了发生反应仍然需要热活化。酶与底物的结合可能放能,也可能吸能。过渡态的自由能表示反应进行前必须克服的能障。非催化反应中过渡态的自由能比使用催化剂的反应(如酶)高得多,因此非催化反应过程进行得缓慢。

多种底物和产物参与反应的动力学更为复杂, 尽管动力学仍以 Michaelis-Menten 关系式为基础, 但仍很复杂, 为了充分了解其动力学特征, 常常需要借助于计算机。然而, 假如只有一种大过量底物存在, 它的浓度通常成为速度的限制因素, 这样可把反应的速度简化, 按标准的 Michaelis-Menten 式来描述。

化学反应的特点在于反应物与产物间的平衡常数。然而, 一般来说, 酶催化反应不能用其催化的反应终点或平衡常数来描述。其原因一方面是由于理论酶学研究强调初速度的测定, 另一方面是用实验测定平衡常数有困难。例如由于微生物污染或由于需要延长保温时间和高浓度产物存在而使副反应变得明显。一个出色的例子是 ven Beynum 等人(1980)的工作, 他们研究了葡萄糖淀粉酶水解淀粉的反应平衡点。

影响酶催化反应平衡点的位置及反应产物产率的最重要因素是反应的总自由能变化, 可用以下公式描述。

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3.10)$$

酶促反应达到接近化学平衡点的程度还决定于产物抑制作用等因素, 各种酶对产物抑制作用的敏感程度具有明显的差异。这个参数是决定达到实际平衡点的最重要因素, 特别在工业酶学上选用高浓度底物时就显得更重要。

酶的固定化也会影响反应平衡点, 这可通过有选择地把底物与载体隔开的方法使与酶接触处产物的局部浓度降低。酶与反应物相比, 浓度很高时, 反应平衡点也会受到影响。结果使相当比例的反应物是以与酶形成的复合物形式存在, 而使它们的有效浓度降低。这一因素在工业酶学上可能是重要的, 因为工业生产中常采用较高浓度的酶, 且要求底物转化成产物的转化程度高, 酶能够进行“逆”作用。

更详细的讨论可参阅由生物化学国际联合会命名委员会

(The Nomenclature committee of the Int. Union of Biochem) 出版的《酶动力学符号和术语》[Biochem. J. (1983) 213, 516—517 和 Eur. J. Biochem. (1982) 128, 281—291]。

3.7 pH 对酶活性的影响

通常,酶只在有限的 pH 范围内起作用。一般地说,酶的活性具有确定的最适 pH,像其他蛋白质一样,酶具有许多可解离的基团,因此 pH 变化会引起酶的构象、酶与底物的结合能力以及酶活性中心基团的催化活性的改变。这些影响可能引起最大反应速度 (V_{\max})、酶对底物的亲和力 (K_m) 或酶的稳定性发生变化。酶的稳定性取决于酶在不适当的 pH 条件下保持的时间。同样,底物的可解离基团也会受到 pH 的影响,在酶-底物复合物的形成过程中这些基团可能是很重要的。所有这些影响可以一起出现,也可能单独出现。当发现酶有宽的最适 pH 时(例如蔗糖酶),一般是由于底物不能离子化。许多工业酶反应中, pH 并不保持恒定,在反应时会发生变化,这主要取决于参与反应的底物和产物的缓冲能力。pH 也会影响酶稳定性,因此最适操作 pH 通常要兼顾 pH 对酶活性的影响和对酶稳定性的影响。

3.8 温度对酶活性的影响

同其他化学反应一样,酶促反应速度随温度升高而加快,这种影响可用阿雷尼厄斯 (Arrhenius) 关系式来描述

$$K = Ae^{-E/RT} \quad (3.11)$$

K 为反应速度常数, A 为阿雷尼厄斯常数, E 为活化能, R 为气体常数, T 为绝对温度。酶促反应的活化能的范围一般

在 4—20 kcal¹⁾/mol, 因此温度每升高 10℃, 反应速度增加 0—1 倍。温度也以同样的方式影响酶的稳定性, 酶变性的活化能范围为 40—130 kcal/mol, 因此反应进行的最适温度是升高温度引起的双重效应的折衷。在较高温度下, 酶活性增加, 但稳定性降低, 这就需考虑酶使用时间的长短。但个别酶在 100℃ 以上仍保持活性, 如腺苷酸激酶甚至在 pH 1.0、100℃ 下仍保留活性 (Chiga 和 Plaut, 1960)。相反, 有些酶在低温下也不稳定, 这大概是由于对保持酶的活性构像起重要作用的疏水力的强度随温度的降低而下降。

温度也会影响反应的平衡点 (K), 如下式所示

$$\frac{\partial \ln k}{\partial T} = \frac{AH}{RT^2} \quad (3.12)$$

3.9 酶抑制作用

酶的抑制作用是一个重要的论题, 因为通过对抑制作用的研究能得到有关酶的结构和作用机理的有价值的知识; 同时为了使酶催化反应的活性最高, 必须把抑制作用减到最小。事实上, 有时可用酶对化学上类似的不同抑制剂的反应方式来显示酶的特性 (Fullbrook 和 Slocombe, 1970)。

抑制作用有四种常见类型。当抑制剂分子与酶发生不可逆结合时为不可逆抑制作用, 这种对酶分子结构的化学修饰作用会使酶活性丧失或大大降低。例如二异丙基氟磷酸 (DFP) 抑制活性中心有反应性的丝氨酸残基的酶, 如乙酰胆碱酯酶。这样它们可作为活性中心的探针, 也可作为神经毒剂。另外还有重金属(如铅和汞), 它们和酶活性中心的巯基作用。

1) 1 cal = 4.1868 J。

然而，不是所有的酶抑制剂都发生这类问题，有许多是很有应用价值的，比如棒酸 (clavulinic acid) 是能引起青霉素失去活性的 β -内酰胺酶的抑制剂，因此是一种重要的抗生素。

可逆抑制作用有三种类型。竞争性抑制作用可用增加底物浓度来降低其作用；非竞争性抑制作用是不能用增加底物浓度的方法减少的；过量底物抑制作用是由于酶与底物形成不能转为产物的复合物造成的。使用较低的底物浓度可减少

这种抑制作用，即 $E \xrightleftharpoons{ES'} E + P$ 。竞争性抑制剂与正常底物分子竞争，占据了形成可逆的酶-抑制剂复合物的酶活性中心，其特性可用复合物的解离常数 K_i 值来说明。具有非竞争性抑制作用的抑制剂也可和酶形成可逆的复合物，但结合位点不是在活性中心上，因此用增加底物浓度并不降低这种抑制作用。

这些抑制剂在较低浓度下对 Michaelis-Menten 方程的影响可用以下方程描述。

竞争性抑制：

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m(1 + [I]/K_i)} \quad (3.13)$$

非竞争性抑制：

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{(1 + [I]/K_i)[S] + K_m} \quad (3.14)$$

底物抑制：

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m + [S]^2/K_i} \quad (3.15)$$

式中 $[I]$ 为抑制剂浓度， K_i 为抑制常数，它定义为抑制剂浓度，在这个浓度下酶的 V_{\max} 减半(非竞争性)或者 K_m 加

倍(竞争性), K_i 为酶-底物复合物的解离常数。

在竞争性抑制和底物抑制作用存在时, K_m 值会发生变化,而在非竞争性抑制和底物抑制作用下,会出现 V_{max} 值的变化。例如有竞争性抑制作用时,测得的表观 K_m 比无抑制剂存在测得的真实 K_m 值大些,但所得的 V_{max} 值不变,而有非竞争性抑制存在时,有抑制剂存在时的 V_{max} 值减小,但 K_m 值不受抑制剂的影响。

底物的抑制作用不常见,在低底物浓度下抑制作用不明显,并且遵循 Michealis-Menten 动力学;但在高底物浓度下就会出现抑制。许多底物中常常含有低浓度的抑制剂,只有在连续大量使用高生产能力的底物时,抑制作用才变得明显,因此需要对所用的原料进行严格质量控制。还有许多更复杂的抑制形式,但不常见。还要注意底物中存在的酶激活剂或反应过程中产生的酶激活剂。例如批式法测定的酶活性会低于有底物抑制或产物活化作用存在的柱式反应器所达到的酶活性,而当底物活化作用或产物抑制作用存在时,又会高于柱反应器达到的酶活性。酶抑制作用的重要工业实例是水解乳清中的乳糖时,半乳糖对 β -半乳糖苷酶(乳糖酶)的抑制作用。

3.10 酶催化剂的各种类型

几十年来,酶一直是人们感兴趣的研究课题,现在已发展成为重要的工业催化剂。酶技术的任务就是要充分利用酶催化作用的优点,如在温和反应条件下的高度立体专一性,同时又要克服酶的固有的缺点,如不稳定性。酶的工业应用要兼顾科学和技术的可能性与工业生产的需要。目前人们对生物化学和微生物学知识的应用所做的努力,同上世纪末对化学

的潜在应用进行的开发并最终出现化学工程领域和许多新的工业部门的阶段极其相似。

酶催化剂可分为几个主要类型,包括完整细胞、细胞器和游离或固定化形式使用的酶。然而有时不同类型之间的差异是比较模糊的,例如固定化细胞制剂中发生的细胞生长,固定化细胞在使用中自溶,或酶固定化在细胞表面等。

发酵细胞和可溶性酶的使用其重要性早已确立,近年来固定化酶和固定化细胞在工业上的应用越来越普遍,最近人们又对可溶性酶在双相反应混合物中的使用表现出很大兴趣。

单一种形式的催化剂不能普遍应用并获得成功。理想的形式是采用多种一系列适用于工业生产的生物催化剂,它们中的一种或多种可容易地应用于任何特殊的需求。随着对固定化技术的进一步了解,以及对使用固定化酶和固定化细胞的优点估价的更充分,可以预料酶将会得到更多的实际应用。

3.11 酶与化学催化剂的比较

与化学催化剂相比,酶具有许多优点。包括催化的反应种类多;使用条件温和,当使用的反应物不稳定时这一点就特别重要;以及降低能耗。例如,化学固氮的哈伯(Haber)工艺,使用的是200—1 000大气压,500℃。其他的优点是转化率高,产生的污染物少,并可得到专一的反应。特别是许多有机化学家被酶基催化所吸引,原因是酶能够区分对映体之间和对映基团之间的差别,也能对具有潜手性中心的分子面进行识别(Jones, 1976 a、b),同时这样的专一反应可在水溶液中进行。生化反应所具有的反应速度和专一性,在半衰期短的放射性同位素化合物的制备上是很有用的。然而生

物催化剂(如固定化细胞)常有复杂的要求,如需要辅因子,而且一般要比化学催化剂的稳定性差,因此需要精确控制反应条件。一些经济因素也会影响催化剂的选择,如化学过程要耗用大量的能量,常以石油化学工业为基础,而生物催化剂并不需要输入大量的能,一般是使用可再生的生物资源。因此目前在食品和制药工业中使用的生物催化剂,今后将会在重化工工业上得到应用。

3.12 酶与发酵的比较

目前,发酵微生物是工业生物催化剂使用的主要形式,它们的最大优点是多用性,这可用现在使用的工艺过程的广泛性和精细复杂性来说明。然而通常需使用复杂昂贵的营养物,发酵时这些营养物的相当大部分用作能源,即使是细胞完成增殖后,在静止期内形成生化物质时也是如此。发酵的连续操作也比较困难。许多分离出来的酶工作寿命要比发酵细胞的工作寿命长。发酵的投资及管理费用高,特别是需要高通气比和无菌条件时成本更高。而且发酵结束后从复杂的稀培养基中分离所需产物往往是困难的,费用也高。还有,必须收集和處理菌细胞和用过的发酵培养基。批与批之间的差异也必须考虑。应当指出,大规模发酵设备排放废物的 BOD 值高达 200—400 mg/l,废物中还可能含有生物反应性分子,例如抗生素类物质,它们会干扰常规生物废物处理系统。因此必须注意有可能造成严重的环境污染问题。

相比之下,固定化酶和固定化细胞操作方便,似乎对微生物污染不太敏感,催化剂与产物的分离也容易。固定化酶的使用有助于对整个反应的控制,最终提高产物的产率和质量。固定化一般可增加酶的稳定性,容易实现连续操作或在批式

操作中反复使用。此外,因为非增殖的固定化细胞仅需要维持催化反应的能量,因此产物的产率要比发酵法高。固定化细胞的使用使细胞生长条件及反应产物形成条件的最优化更趋完备,因为这两个阶段是分开进行的,而在发酵中这两步往往是同时进行,至少是在同一设备内进行,因此操作条件只能是两种要求之间的折衷。

Venkatasubramanian 等(1978)对批式发酵和用胶原固定化棒状杆菌细胞相连的酶连续生产调味剂谷氨酸单钠的经济效益进行了比较。结果是使用固定化细胞的工厂总固定资产投资、操作费用和其他费用比较低;但总生产成本较高,因为需要定期更换固定化细胞。然而,由于固定化细胞工艺需要的设备投资较低,它的投资回收可达 50%,而使用发酵工艺的投资回收为 36%。

3.13 固定化生物催化剂

将游离酶、细胞或细胞器等的运动完全或基本上限制在一定空间内的过程称为固定化,一般得到的是水不溶形式的酶。固定化酶有时又叫作结合酶、不溶酶、载体或基质联结酶等。需要注意,固定化催化剂不仅是酶,当使用昂贵的金属催化剂时,用固定化学催化剂也是有好处的。当动植物和微生物腐烂释放出的酶吸附到土壤颗粒上时,也可以在土壤中发现天然的固定化酶,而固定化细胞是以天然菌丝小球形式存在的。

工业上的酶和细胞常以固定化形式使用,因为这样能重复或连续使用生物催化剂,这是最重要的。连续使用对于保持固定化生物催化剂的恒定环境特别重要,这是保持酶稳定性的重要因素,因为可防止酶和细胞被产物或废物流污染。这

样酶催化的工艺过程的投资及经常性的开支可通过酶的固定明显降下来(图 3.3)。

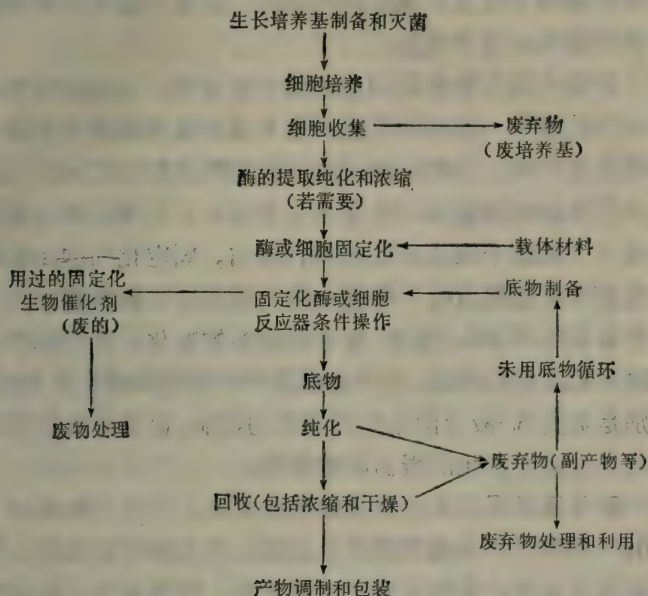


图 3.3 工业过程中以酶催化反应为主要步骤的典型操作顺序概图。

游离细胞和酶很难反复或连续使用,因为它们粒度太小难于过滤回收,而且离心方法回收的费用又太高。将酶结合到水溶性聚合物上可制备成水溶性固定化酶,如 Marshall 和 Hamphries (1977) 制备的水溶性过氧化氢酶-葡聚糖复合物。Charles 等 (1974) 把溶菌酶偶联到海藻酸上,如果将 pH 调到 4 以上,这样的结合可以逆转以便提高对大分子底物的活性。固定化酶或固定化细胞工艺容易实现自动化,有助于发挥各种类型反应器配置方式的优点。这包括 pH 和温度的快速控制,搅拌式反应器中良好的气体传送,以及最大限度减少填充床式反应器中产物抑制作用。此外,由于酶の利用

比较有效,需生长的细胞量较少,因而需要处理的发酵废物也少。使用固定化细胞时,通过反应器的流速可超过发酵培养物中细胞最大比生长速度时的流速,这样可避免细胞的破坏和底物粘度的过度增加。

固定化常可使酶和细胞的稳定性增加,也能使酶浓度增加,这样,使用小得多的反应器就可达到使用游离生物催化剂相同的生产率;并能以简便得多的方式进行工艺操作。固定化作用使酶或细胞均匀分布在反应器中,以保证均匀地向每个酶分子或每个细胞提供底物。最后,固定化细胞和酶的一个重要的普遍优点在于固定化载体能缓冲细胞和酶,以抵抗整个溶剂中的 pH、温度、离子强度等的变化。这种保护作用反映在稳定性的提高,同时也可以保护细胞和酶免受剪切力,特别是免受气-液界面上的剪切力的影响,也可免受微生物污染物及污染所产生的蛋白酶的影响。

偶尔还发现固定化有其独特的优点,例如 Duvnjak 和 Lilly (1976) 发现葡萄糖氧化酶固定化在氧化锰载体上能分解酶促反应所产生的有毒的过氧化氢。固定化也可作为反应完成后从溶液中回收酶,然后再溶解及再使用的方法。

遗憾的是,由于在固定化过程中产生热和 pH 变化或游离基等的作用通常使酶变性,引起某些酶活性的损失。但在某种情况下,这种效应是有用的,可以使需要固定化的酶能够抗变性条件,而使催化不良副反应的酶发生变性。固定化是工艺上多加的步骤,会额外增加成本,但用减少投资和过程运转成本等,收回这种外加成本已足足有余。颗粒状的固定化生物催化剂用在反应器中要比等量的游离酶或细胞所占的体积大,对于固定化细胞这种因素特别重要,因为微生物细胞的直径约为 $1-10\text{ }\mu\text{m}$,而典型的酶分子直径仅有 $30-100\text{ }\text{\AA}$ 。通常细胞中的酶不到细胞物质的 1%,在固定化细胞颗粒中,其

余的细胞物质仍要占据空间。

固定化酶和固定化细胞可以应用在合成化学、酶电极、热敏元件和分析仪器上(见A部分第5章),在以体外支路形式治疗上也是有用的。希望研究蛋白质的三级和亚单位结构的生物化学家也使用酶固定化技术,并且这个技术可以作为膜结合蛋白质和膜结合酶的模型(Bickerstaff, 1984)。应注意,以固定化形式使用的其他生物材料也很普遍,例如免疫球蛋白(Genung 和 Hsu, 1978)及药物的固定化制剂作为临床植入物时,可在长时间内缓慢释放药物,保持药效。

使用滤器可以回收固定化生物催化剂,如在填充床式反应器中那样,也可用重力沉降法使生物催化剂保留在反应器内回收。如果生物催化剂颗粒很小,可用离心法回收。显然,不希望使用任何辅助设备(如篮式离心机),因此最好把生物催化剂持留住作为反应器的完整部分(图3.3)。

现在越来越普遍使用的是固定化细胞而不是发酵细胞和固定化酶。将细胞包埋在凝胶型介质中制备固定化细胞是最有效用的,也是最广泛使用的方法。理想的方法应该是温和的,不使细胞中需要的酶失活,因此在固定化过程中应当避免产生热、pH变化和形成游离基。固定化方法应稳定、安全、便宜、简单、通用、易放大,使用的试剂无毒,以利于大规模应用。固定化细胞颗粒也应当小,使内扩散的限制降到最低限度,颗粒要是大小均一、球形和表面光滑的,以便使底物溶液通过固定化细胞填充床柱反应器时流速均匀。另外应有较好的机械强度,这样才能抵抗柱反应器内的挤压,以及抗搅拌反应器内的磨损。

目前,固定化细胞有两种主要使用方式。第一种是用与细胞相连的一种酶(或只是少数几种酶)催化生物转化。它们大部分是简单的水解反应和异构化反应。这些过程和传统的

固定化酶过程很相似。不需要保留细胞的生存能力，甚至不需保留细胞结构的完整性，也不需要发生一般的辅酶和能量的再生。例如用固定化野胡萝卜 (*Daucus carota*) 细胞可将茛菪配质生物转化为 5- β -羟基茛菪配质 (Jones 和 Veliky, 1981); 用固定化大黄欧文氏菌 (*Erwinia rhapontici*) 细胞将蔗糖异构化为异麦芽蔗糖 (Cheetham 等, 1982); 用凝胶包埋的红酵母 (*Rhodotorula menata* var. *texensis*) 细胞对溶在有机溶剂中的底物琥珀酸二甲酯进行立体选择性水解 (Omata 等, 1981)。然而, 在某些情况下, 也比较复杂的生物转化, 例如将山梨糖转化为山梨酮的生黑葡糖酸杆菌 (*Gluconobacter melanogenus*) 需要有完整的呼吸链 (Martin 和 Perlman, 1976), 而且辅酶 A 的形成 (Shimizu 等, 1975) 也是很有趣的。

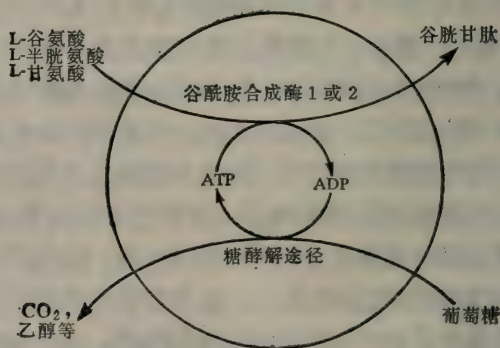
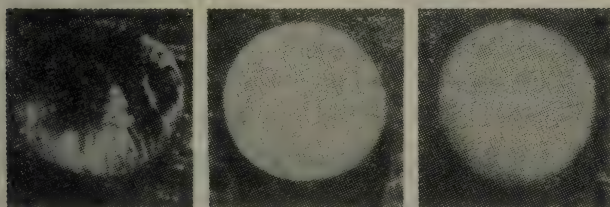


图 3.4 谷胱甘肽生产系统的示意图。图内的环形线表示聚丙烯酰胺网络的界面 (Murata 等, 1978)。谷氨酰胺合成酶 1 和 2 来自空气干燥的大肠杆菌。糖酵解途径用的是酿酒酵母丙酮干粉。

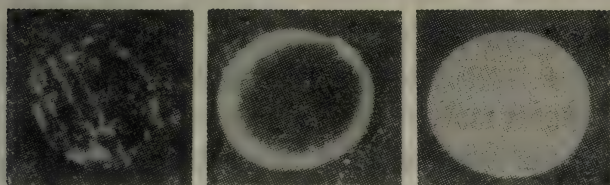
第二种使用方式是固定化活细胞, 并供给含有被转化底物的生长培养基, 这样的反应更接近传统的发酵, 特别是接近固体发酵, 而且通常生产出初级代谢产物。随着固定化细胞

的生长和分裂可同时完成复杂的多步转化,同时发生辅酶再生和 ATP 的更新。但细胞从载体向外长出及需要保持无菌条件,可能是存在的主要问题。例如用固定化粘质赛氏杆菌 (*Serratia marcescens*) 细胞生产 L-异亮氨酸 (Wada 等, 1980 a), 用固定化酿酒酵母细胞生产谷胱甘肽 (Murata 等, 1978, 1981) (图 3.4), 用固定化芽孢杆菌细胞生产杆菌肽 (Morikawa 等, 1979), 和用固定化酿酒酵母细胞生产酒精 (Wada 等, 1980 b) (图 3.5)。

凝胶珠



凝胶珠剖面



(i)

(ii)

(iii)

图 3.5 固定化细胞小球的剖面照片。(i) 与培养物保温前,接种少量细胞。(ii) 在营养物中保温培养后,细胞于凝胶内生长。(iii) 小球内均匀固定化的高浓度细胞 (Wada 等, 1980b)。

固定化细胞也可作为酶源使用,比如固定化的佛氏链霉菌 (*Streptomyces floridiae*) 分泌蛋白酶 (Kokuba 等, 1981), 用固定化枯草芽孢杆菌细胞生产 α -淀粉酶 (Kokuba 等, 1978) (图 3.6)。

亚细胞器、植物细胞、甚至动物细胞均可采用类似的技术进行固定化。例如 Aizawa 等 (1980) 将小牛心线粒体的非

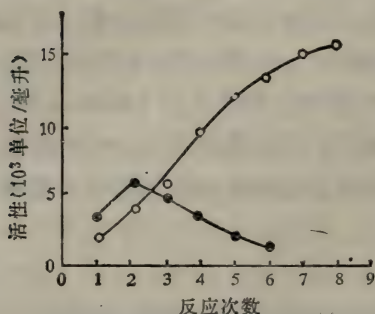


图 3.6 用固定化完整细胞生产 α 淀粉酶

(○) 固定化完整细胞; (●) 洗过的细胞 (Kokubu 等, 1978)。

磷酸化电子传递体粒子固定于琼脂中, 使 NADH 或琥珀酸氧化, 因此可与氧电极相连作为电化学测定的装置。已经表明用固定化叶绿体可以固定二氧化碳 (Kierstam 和 Bucke, 1977; Karube 等, 1979

b)。

将大鼠的胰腺 β 细胞包在海藻酸盐-聚赖氨酸

复合物的微型胶囊中, 葡萄糖可透过微型胶囊膜, 而抗体却不能穿过, 因此把它埋植到患糖尿病的大鼠体内时不会产生排斥作用 (Lim 和 Sun, 1980)。胰岛细胞可继续分泌胰岛素, 因此可以逆转试验诱发的大鼠糖尿病。最近报道一项很有趣的进展, 是将蓝细菌的完整丝状体包埋在海藻酸盐凝胶中至少可连续固氮 130 小时。所固定的氮有 90% 以上是以氨的形式从细胞中释放出来, 这是通过抑制谷氨酰胺合成酶而达到的, 该酶是参与氨同化的第一个酶。但是这样的处理会引起细胞稳定性的明显降低 (Musgrave 等, 1982)。

3.14 固定化酶和固定化细胞的比较

选用固定化酶或固定化细胞的原则, 非常相似于可溶性纯酶或粗酶作生物催化剂的选择原则。固定化细胞和粗酶比较便宜, 并可大量获得, 但与固定化酶或纯化的可溶酶相比,

专一性较差。代替固定化细胞的是使用越来越复杂的具有固定化辅因子的固定化酶制剂 (Mansson 等, 1976)、共固定化酶 (Srere 等, 1973; Lawrence 和 Okey, 1973; Tramper 等, 1978)、复杂的酶组分(如用在短杆菌肽 S 的合成中的系统) (Hamillon 等, 1974), 以及用固相化学合成的有酶活性的蛋白质。

使用固定化细胞,可以避免酶与细胞、酶与细胞碎片的分离,也不需要进行耗资多、费时、繁琐、产率通常很低并且难于放大的酶分离纯化过程。由于酶在细胞内处于适宜的自然环境中,不会发生酶固定化时常遇到的共价修饰作用和构象变化的影响,在固定化时活性损失少。细胞膜也会保护酶免受如剪切力和气泡等机械变性作用,而且可以排除重金属离子、有机溶剂等化学变性剂的作用。大多数固定化细胞制剂中的细胞不会受到侵入微生物的作用,而且使用无氮底物,操作无需保持无菌条件。可见固定化细胞的酶活性的操作稳定性一般比相应的固定化酶的操作稳定性高,特别是固定化细胞活性可在原位再生时,其操作稳定性更好。

对于需要使用偶联酶,需要昂贵的辅因子和能源(如 NADH 或 ATP)的吸能合成反应,以及需要使用完整代谢途径或完整细胞代谢途径的过程,使用固定化细胞的方法比使用固定化酶优越。固定化细胞的生理状态有很大差别,可使用各种术语来描述:如活的或死的细胞;有生存能力或无生存能力细胞;完整的或破碎的细胞等。因此,对固定化细胞的精确命名需取得某些一致看法。

当酶从细胞中提取出来后不稳定,固定化时容易失活,或者需要与代谢途径相关的调节机制时,必须使用固定化细胞。产胞外酶的细胞不能采用细胞固定化的方法,除非在使用过程中酶会不断从固定化细胞中渗出时才可采用,比如包埋在

聚丙烯酰胺中的枯草芽孢杆菌 α -淀粉酶(Kokuba 等, 1978)。在批式方法中, 生成的 α -淀粉酶是洗涤细胞所形成的三倍, 产生的酶随循环反复使用次数的增加而增加, 直到七次以后达到稳定态(图 3.6)。由于缺乏营养或缺少新生细胞可利用的空间, 固定化细胞会处于人为静止状态或静休状态, 因此细胞生长和产物形成并不一致。细胞的合成活性只能保持有限时间, 这取决于有关酶的稳定性。由于酶的可逆和不可逆失活, 代谢中间产物的损失及代谢物的抑制, 活性会出现减退。由于缺乏必需营养物, 细胞仅进行与生长无关的代谢作用, 如渗透和 pH 调节及大分子的转化。这种维持所需的能量随细胞类型和环境条件而变化。细胞存活能力延长与维持能量需求密切有关的内源代谢速率低有关, 这可解释固定化细胞活性的高稳定性。固定化细胞的酶活性再生可以大大提高操作稳定性。可用重复诱导或引发固定细胞原位增殖来进行再生。

因为产生副反应和所需生化产物的进一步代谢, 使固定化完整细胞生产的产物纯度可能比固定化酶低, 因此, 在筛选准备用于细胞固定化的微生物时应当考虑可能发生的副反应。这些不需要的反应, 通常可采用选择变性或抑制细胞中不需要酶的活性的方法来消除, 或使用纯度较高的底物。例如生产苹果酸时, 在底物溶液中加入胆酸盐就可以阻止副反应产物琥珀酸的生成(Sato 等, 1976)。胆酸盐的作用可能是使合成琥珀酸所需的酶选择性失活, 更可能是破坏细胞壁的完整性, 进而使琥珀酸形成所需要的辅因子丢失。后一种推测更有可能因为胆酸盐处理后, 固定化细胞的活性增加, 这大概是由于失去完整细胞膜对底物或产物传递的扩散障碍。这样的渗透过程使胞质酶功能上相当于膜结合酶或外周胞质区酶。也能避免所需产物的进一步代谢。如在尿刊酸生产

中,70℃条件下加热 30 分钟尿刊酸酶即选择性失活。(Yamamoto 等, 1974 b)。另外,也可选用合成对降解活性比大的细胞,如固定化大肠杆菌细胞产生 6-氨基青霉烷酸的青霉素酰化酶活性要比青霉素酶活性高 10 倍 (Chibata 等, 1977)。选择最好的微生物也是重要的。如生产 L-瓜氨酸中,大多数微生物都用鸟氨酸氨甲酰基转移酶,将瓜氨酸转化为 L-鸟氨酸。但 Yamamoto 等 (1974 a) 发现,恶臭假单胞菌不能将需要的产物进一步转化。使用固定化细胞的产率要比相应的固定化酶低,因为要消耗底物以向细胞供给能量。

最终产物会被细胞及来自固定化细胞的一些物质所污染,特别是细胞使用相当长时间后,常常会发生自溶。失落的细胞可以是原来的固定化细胞,而更常见的是固定化细胞增殖产生的细胞。当反应器无营养物或有抗生素存在的条件下运转时,只有原来固定化的细胞从柱中漏出。然而,当细胞固定化后仍保持其完整的代谢能力,而且有可能进行增殖时,细胞的漏出就特别明显。

固定化细胞颗粒一般比固定化酶的颗粒大一个数量级,细胞与酶相比也部分反映出这种情况。这也表明酶有较高的催化剂密度 ($\times 10-100$), 因此对活性扩散的限制就比较严重,也就限制了所用固定化酶的颗粒大小。

由于固定化细胞相对比较大,高分子量底物只能被超滤器内使用的固定化细胞所转化,而低分子量的产物可以通过超滤膜。其他的缺点是在单位体积反应器内固定化细胞的活性总是比相应的固定化酶的活性低,要达到相同的生产效率,就要使用较大的反应器或更长的存留时间。固定化细胞制剂的催化位点密度也比相应的固定化酶制剂低,因此同时进行的酶促和非酶促反应之间的竞争就会加剧,在葡萄糖异构化时形成阿洛酮糖的非酶促反应就是一个实例 (Bucke, 1977)。

由于细胞壁或细胞膜的存在,使用固定化细胞时对反应速率扩散的限制程度(传质效应)大。因此要强调使用高孔度固定化载体和对细胞进行透性化处理,例如用甲苯、二甲基亚砷处理,或用制霉菌素,这种抗生素会可逆地形成小孔(Mosbach, 1982)。最后,固定化细胞制剂的活性和稳定性会受到胞内蛋白酶的不利影响,需要使用蛋白酶抑制剂。

3.15 固定化载体及方法的评价

在选择适宜的固定化载体和方法上需要灵活运用。例如将酶固定在微孔膜上,然后装在柱反应器内使用,也可把酶固定在原来作为内燃机后燃室催化剂的陶瓷块上(Benoit 和 Kohler, 1975)。已发现以气溶胶形式提供的酵母 RNA 底物,可使固定化脱氧核糖核酸酶活性有明显改进(Kirwam 等, 1974)。使用固定化酶的最早的工艺之一如图 3.7 所示。

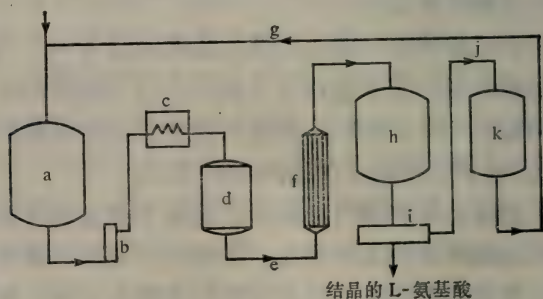


图 3.7 用固定化氨基酰化酶从消旋混合物生产 L-氨基酸的连续工艺流程图(Chibata 等, 1976)。(a) 乙酰基-DL-氨基酸贮罐, (b) 过滤器, (c) 热交换器, (d) 酶柱, (e) L-氨基酸流出液, (f) 热交换器, (g) DL-乙酰基氨基酸物流, (h) 结晶罐, (i) 分离器, (j) 乙酰基-D-氨基酸物流, (k) 消旋罐。

固定化方法可以是“主动型”,如共价偶联酶,也可以是

“被动型”,如吸附酶。作为固定化载体可以是大小、形状、密度和孔隙度不同的天然或合成的有机或无机材料,可以是片状、管状、纤维状、筒状,最通用的是球状。White 和 Kennedy (1980) 曾对此作过评述。载体颗粒大小是个重要因素,因为它决定着内扩散阻力对酶活性的影响程度、填充床柱反应器中的压降、流动床反应器上所需的流动速度、搅拌反应器内使颗粒悬浮所需的输入功率。显然常会有些特殊要求,例如固定化酶的催化反应产生过氧化氢时,使用共固定化的过氧化氢酶或氧化锰会在过氧化氢引起酶失活之前将其催化分解。

选用的固定化方法要简便而且可重复,同时应当条件温和、价廉、安全、通用,并且容易大规模使用。实际应用的固定化方法取决于工艺过程的科学性、工程和经济等多方面因素。使用的方法还应当便宜,不产生细粒,能在广泛的条件下使用,以便能使用各种不同细胞和酶,同时可以适应不同类型细胞和酶的共固定化。选用的固定化方法还应当能做到容易控制固定化的细胞量或酶量,并且在贮存和工作时酶和细胞不应从载体上脱漏。固定化过程要避免使用危险的设备、有毒和有腐蚀性的化学试剂。例如使用溴化氰或 2-氨基-4, 6-二氯均三氮嗪活化纤维素载体及使用许多种蛋白质交联剂都是有危险的,尤其是大规模使用。为了避免载体与底物或产物之间产生无益的分配作用,载体材料应不带电荷并具有亲水性。

在细胞收集和固定化时,尽可能减小 pH、渗透压和温度的变动,以便最大限度地保留高的酶活性。固定化酶使用时将底物溶液预先过滤,或用紫外线、pH 和温度冲击,或用化学杀菌剂进行灭菌以防止微生物污染。

人们希望能同时进行酶的纯化、浓缩和固定化。实际上单克隆抗体是便宜的,可作为固定化试剂使用。固定化酶和

固定化细胞至今没有公认的“最佳”方法，虽然有些公司或研究小组可能有他们最满意的方法。因此在试验早期对一些可采用的方法进行筛选是极其重要的。这是因为固定化生物催化剂的活性、稳定性及使用难易程度的差别很大，并且不能预料。有时发现，固定化后马上测定，保留的活性的比例很高，但失活也很快，可能是由于固定化反应使酶变得不稳定。

在选择固定化方法时，必须考虑许多因素，包括反应的化学本质和动力学特性，反应物和生物催化剂的成本及化学与物理稳定性，固定化作用的效果取决于生物催化剂的活性和稳定性，所需产物的收率和纯度，以及其他一些较特殊的影响。由于一些重要的变量并不是单独起作用，同时一些无关的次要作用结合起来会产生十分不良的影响，如失去稳定性或形成过量的副产物，因此对这些因素必须兼顾考虑，可以通过编制一个说明各种因素的半定量的“相互关系图”来简化这一过程。生产的最终规模和操作条件及产物的预定用途也必须加以考虑。

3.15.1 固定化生物催化剂特性

固定化酶制剂最终的活性是由以下因素决定的：原始细胞或酶的活性，能持久固定的细胞或酶的浓度，固定化后保留的酶活性，分配和扩散效应对酶活性的影响。值得注意的是，由于使用高浓度底物，酶固定化后 K_m 的增加，可能不会对使用有影响，而 V_{max} 的减小显然是不利的。

在典型的固定化试验中，目的是使单位体积固定化载体负载有尽可能高的酶活性。因此一般要测定以下参数：所用游离酶的体积、酶活性及蛋白质含量；所用载体的重量、颗粒大小、分布、孔率及物理、化学性质；以及固定化酶的酶活性和固定化完成后残留的游离酶体积、酶活性和蛋白质浓度。细

胞固定化后也要做类似的测定。另外还应当注意固定化时或与底物接触时载体的膨胀、收缩、聚集或破碎、生物催化剂从载体的漏出、固定化试剂或游离酶在载体孔隙内的输送,以及底物是否容易扩散到生物催化剂颗粒内部等问题。

通常,固定化作用是不可逆的。因此固定化过程受酶在载体材料微孔内的慢扩散作用控制。固定化后酶最初的分布与颗粒外围的酶浓度不均一,这种效应有时可用固定化酶染色来证明 (Carleymith 等, 1980)。经过足够的时间建立平衡后,酶在载体中可达到均匀分布,只要载体内固定化位点的分布是均匀的,并有足够的酶可用于使载体达到饱和。当酶在表面上分布不均匀时,其活性要比相应的均匀分布的制剂高。这是由于扩散距离较短使扩散阻力的作用显得不怎么重要。然而,这样的制剂往往要比前者失活快,因为它们与变性剂的接触较多。因此需要对固定化酶的以下两方面进行兼顾,即酶集中于接近表面部分具有较高活性,但稳定性较差的固定化酶和酶均匀分布活性较低,而且在多步反应存在时选择性比较差,但稳定性较好的固定化酶。这种选择可使游离酶和固定化酶之间的差别平行,尽管固定化酶活性一般要低些,但通常是更稳定。

固定化方法见 A 部分第 4 章,我们将大黄欧文氏菌细胞包埋在海藻酸钙凝胶小丸中,以中试规模生产异麦芽蔗糖 (Cheetham 等, 1982)。

3.16 共固定化酶

通常是将一种酶固定化,但一个新的引人注目的研究领域是将二种或多种酶共固定化,以形成多功能的生物催化剂。它们能够达到比用单一酶更复杂的转化。比如将葡萄糖氧化

酶和过氧化氢酶共固定化, 过氧化氢酶会把由葡萄糖氧化酶产生的过氧化氢在使葡萄糖氧化酶失活之前就分解掉。同样, 黄素氧化酶通过与过氧化氢酶和超氧化物歧化酶 (super-oxide dismutase) 共固定化, 能够很快除去由氧化反应产生的变性剂分子而使黄素氧化酶稳定 (Tramper 等, 1978)。腺苷酸激酶和乙酸激酶已经用聚丙烯酰胺凝胶包埋进行共固定化, 它以乙酰磷酸作为磷酸化试剂, 用于再生 ATP 和(或) ADP。另一个例子是使用与产酶细胞仍相连接的共固定化酶, 可将山梨糖转化为维生素 C 的前体 2-酮-1-古龙酸 (Martin 和 Perlman, 1976)。其他有希望的例子还有: 葡萄糖淀粉酶和葡萄糖异构酶共固定化; 葡萄糖淀粉酶和支链淀粉酶共固定化。酶的共固定化进一步发展是形成自然界不存在的“代谢途径”, 以便进行新的合成。

共固定化系统可能比使用分开的固定化酶更有效, 因为共固定化反应的中间产物在不同酶之间的扩散更容易些。与分开的固定化酶比较, 通常共固定化酶达稳定态之前的停滞时间较短。使用这种技术的主要困难似乎在于确立适合所有使用酶的活性和稳定性等特性的满意的操作条件, 如确定 pH 和温度。例如葡萄糖淀粉酶和葡萄糖异构酶有相似的稳定性, 但最适 pH 不同 (分别为 pH 4.5 和 8.0); 而 β -半乳糖苷酶和葡萄糖异构酶不仅最适 pH 不同, 而且 β -半乳糖苷酶的热稳定性也差。

进一步改进这种系统可以制成含有不同来源的细胞、酶和细胞器的复合共固定化生物催化剂。如 D'Souza 和 Nadkarni (1980) 将葡萄糖氧化酶结合到用诱导产生蔗糖酶和过氧化氢酶活性的酵母细胞上, 将蔗糖转化为果糖和葡萄糖酸。另一个方法是将酶和辅酶共固定化。通过这种方法使辅酶共价结合, 这样使酶的别构位点填满, 从而增加酶的活

性。也可将能再生辅因子的酶或辅因子分别结合到需辅因子的酶上,辅因子就可依次进入每种酶的活性位点,这样,酶的辅因子就进行反复氧化或还原 (Mosbach, 1982)。

3.17 两 相 反 应

与固定化酶或固定化细胞不同的另一种越来越普及的方法是在第二个水相 (如一种有机溶剂) 存在下进行反应 (Lilly, 1983)。这样使通常不溶于水的底物 (如甾族化合物) 保持高浓度。另一种可采用的办法是用能容纳水不混溶底物的第二相 (如烃)。通常不使用水混溶性溶剂, 因为它们酶的强变性剂。但也有些酶例外, 如从金黄色葡萄球菌得到的类异戊二烯醇激酶溶在丁醇和其他溶剂中, 但不容于水中 (Sandermann, 1974) (图 3.8)。相反, 当使用水不混溶溶剂时, 酶只与很低浓度的溶剂分子接触, 并且酶要稳定得多。按常规, 反应是在搅拌反应器中进行, 以便使水相中的酶保持细乳化液状态, 水相可以是连续相, 也可以是分散相。

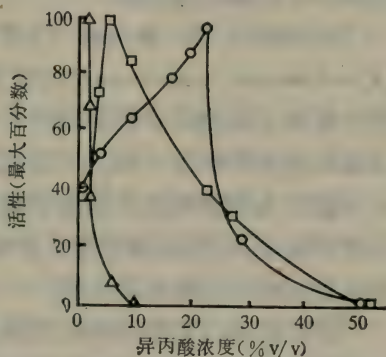


图 3.8 水混溶性有机溶剂异丙醇对胆固醇氧化酶活性的影响。O、Δ和□分别为用 Triton X-100、胰蛋白酶和磷酸缓冲液提取的酶 (Cheetham 等, 1982)。

一般认为微生物和酶只作用溶解的底物, 因此水溶性大大限制了产量和产率, 而使用表面活性剂、水混溶性溶剂和用粉碎成细小颗粒的办法, 可使低水溶性底物易于为细胞或

酶所作用。但这种系统的传质机理还很不清楚。水不溶性有机溶剂是作为底物和产物在有机相和水相之间进行快速传递的媒介。作为底物和产物的贮存器,这些溶剂可把底物或产物对反应的抑制作用减小到最低限度。另外,由于大量的水不溶性底物可溶解在有机相中,这些溶剂使生产一定量产物的反应混合物体积明显减小。另一种可能的优点是氧在有机溶剂中的溶解度一般比在水中溶解度大,这对那些需氧反应的进行可能是有好处的。

Schwartz 和 McCoy (1977) 发现在食油假单孢菌 (*Pseudomonas aleovorans*) 的培养物中加入 20—50% 的环己烷可使辛二烯的环氧衍生物产率增加 5 倍。高达 90% 的辛二烯转化为环氧衍生物。环己烷并没有被转化,产率的增加也不是因为溶解氧浓度增加引起的。单环氧产物对微生物有明显抑制作用,有机溶剂通过使水相中的环氧化物量降低,将使这种抑制作用降到最小值。

许多甾体化合物的转化都是在高浓度有机溶剂存在下进行的,可参阅 Butler (1979) 的综述。例如使用悬浮在四氯化碳中的红色诺卡氏菌细胞糊氧化胆甾醇 (Buckland 等, 1975), 反应体系中仅有的水只是存在于细胞糊中。在 200 ml 四氯化碳中加 100 g 细胞糊产生胆甾烯酮的速度为 7 g/小时。细胞很容易从溶剂中回收,然后可再利用进行反应。反复使用 7 次(使用了 69 小时)以后,细胞仍保留 50% 的初始活力。

在含有机溶剂的反应混合物中也已使用需辅因子的无细胞氧化还原酶。Cremonesi 等 (1973, 1975) 的研究表明,这种系统的最好溶剂是 50% 的醋酸丁酯或四氯化碳。

由于溶剂本身对酶有部分抑制作用, Bhasin 等 (1976) 使用溶解甾体化合物的硅聚合物珠代替溶剂。他们发现用这

种聚合物珠的反应速度要比用有机溶剂的速度高。

水不混溶性溶剂的另一种用途是降低水的活度，使水解反应逆转。Klibanov 等(1977)和 Semenov 等(1981)把胰凝乳蛋白酶固定在玻璃珠上，然后把玻璃珠悬浮在含有乙醇和 N-乙酰色氨酸的氯仿溶液中，此固定化酶可催化水解反应的逆反应，产生酯化氨基酸，产率为 100%；而在水中肽的产率仅为 0.1%。显然在珠的四周形成的结构水层〔能斯特(Nernst)层〕保护了酶免受溶剂的变性作用。使用水混溶性化合物(如甘油或乙醇)降低水的活度，也能使酶促水解反应逆转(Ingalls 等, 1975)。

由于固定化在多孔性载体上的酶处于含水微环境中，很可能会使酶稳定，从而能抵抗溶于水相中的有机溶剂分子或有机溶剂相的变性作用。在这种情况下，使用较疏水的载体可能很重要，这会有助于底物分子向酶的分配作用。例如 β -羟基类固醇脱氢酶固定化在溴化氰活化的 Sepharose 上，稳定性明显增加。在水-乙酸乙酯的两相系统中连续使用两个月仍保留 60% 的初始活性。有机溶剂可作为酶的弱抑制剂(Carrea 等, 1979)。

一个新的有意义的发展是使用含有像葡聚糖和聚乙二醇等两种或多种彼此互不混溶的水相系统(Pallack 和 Whitesides, 1976)。这样的双相水乳化液的表面张力($0.1-100 \mu\text{N/m}$)要比传统的水-油或水不混溶性溶剂-水乳化液的界面张力($1000-2000 \mu\text{N/m}$)小得多。因此在制备和维持这样的水乳化液所需的能量消耗比前一类型的乳化液要小。使用双相水混合物还可将酶或细胞回收到一相中而把反应产物回收到另一相中。例如 Kuhn (1980) 用含有葡聚糖、聚乙二醇和水的双水相系统进行酒精发酵。

3.18 工业酶动力学

使用数学模型可以对复杂的系统（如固定化酶和固定化细胞）的性能进行定量和预测。模拟有助于对大规模反应器特性进行预测，有助于把工艺过程作为整体来理解，确定可能进行改进的特定范围，也有助于进行从实验室向工业化实践的转移。使用的方式应当简单通用，即它们要适用于各种酶或细胞的底物系统，尽管不同系统的酶和细胞在遗传、形态和生物化学方面的特性并不完全相同。

在经典酶学中，是通过测定短时间内底物消耗或产物形成来进行酶活性的初速度测定的。这是采用稀释酶和底物溶液在水溶液中进行的，反应速度等于 V_{\max} 。然而，工业上要使反应完成，常需要使用浓的酶制剂和浓的底物溶液。这就需要反应持续进行较长的一段时间，而且往往是在含有固定化酶或细胞的非均一的溶液中进行，有时在有机溶剂中进行反应。众所周知，传质限制作用对内在动力学会产生重大影响。为了预测起始和因清洗和维修等造成的关停之间响应时间和恢复时间，只对过渡态（不是稳态行为）感兴趣。

由于在工业反应中，平均底物浓度一般不高，采用的是一级或一级与零级混合的动力学，而不采用零级米氏动力学（图 3.9），因此反应速度直接依赖于占优势的底物浓度，即

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m} = \frac{k_2[E][S]}{K_m} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \quad (3.16)$$

反应速度通常由底物量和酶量控制，因此达到一定浓度的产物所需要的时间由酶浓度控制。如果使用批式反应器，反应开始之后很快达到最大反应速度。然而反应过程中酶催化效率降低，为此需要增大酶浓度以保持初始反应速度。当需要

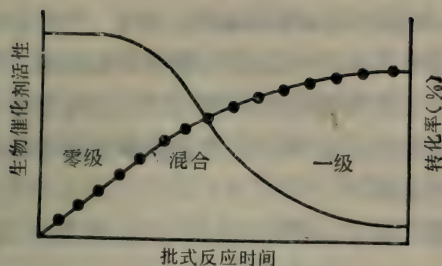


图 3.9 批式酶反应时反应时间对酶活性 (——) 和底物转化为产物的程度 (· —— ·) 的影响, [引自《生物技术原理》(Wiseman, A. 主编), Surrey 大学出版社, 1983]。

使底物保持的转化率进一步提高时, 这个方法特别重要。增加反应物与酶的接触时间(为达到高转化率)就有可能形成化学副产物或生物副产物, 或者进一步使所需的产物代谢掉。如果反应温度升高, 这样的问题也会加重。用固定化葡萄糖异构酶生产高果糖浆时, 重要的副反应是形成有色物质和阿洛酮糖; 另一副反应是在水解苜蓿毒素生产 6-氨基青霉烷酸时发生的 β -内酰胺环水解。一个有用的参数是反应的半衰期, 它是酶将最初底物的一半转化成产物所需的时间。这一术语应与测量酶稳定性的酶半衰期有所区别。

在米氏方程中, 反应速度是产物浓度趋近于零时的酶催化反应速度。在研究酶性质时, 这是一个很有用的参数, 在工业生产中, 一般需要反应完全转化或达到平衡, 将方程与时间结合起来的形式的形式有更大的价值, 即

$$V_{\max} = K_m \ln \frac{[S]}{[S_t]} + ([S] - [S_t]) \quad (3.17)$$

这里 t 为反应时间, $[S]$ 为初始底物浓度, $[S_t]$ 为在时间 t 之后的底物浓度, $([S] - [S_t])$ 为在时间 t 之后产物浓度。这个公式说明, 假设酶是稳定的, 要达到一定产物浓度 (即

$[S] - [S_t]$ 所需的时间和酶浓度 (由于 $V = k + 2[E]$) 之间的关系。这个关系式在工业应用中是重要的, 因为反应速度一般是由改变使用的酶浓度和(或)反应时间而不是由改变底物浓度来控制的; 要测定的最重要参数是可达到的转化程度而不是反应速度。

在一定酶浓度下, 底物浓度从 $[S]$ 变为 $[S_t]$ 所需的反应时间 (t) 可由以下关系式给出:

$$t = \frac{SX + K_m \ln[1/(1 - X)]}{E k_2} \quad (3.18)$$

这里 X 是转化程度, E 为总酶活性, 它在估算酶浓度和使酶浓度降到最低限度以及估算所需保温时间上是有用的。反应半衰期 ($t/2$) 是底物浓度降低到起始浓度一半时所需的时间

$$t/2 = \ln 2 \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{S}{2V_{\max}} \quad (3.19)$$

因此, 反应半衰期越短, 使用酶的活性越大, 和/或所用的底物浓度越低 (Fulbrooke, 1982)。

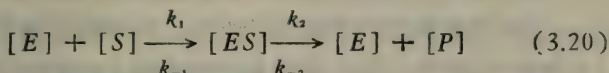
在公式 3.18 中, E 是反应器中存在的酶重量和它的活性 (V)。因此, 可以用 $2\pi r^2 l \rho V$ 代入 E 来计算出具有一定生产能力的反应器尺寸, 这里 r 是反应器的半径, l 为反应器高度, ρ 为酶制剂的密度。

3.18.1 对平衡的影响

只有在酶浓度很低时酶才不会影响化学反应的平衡点; 而在许多重要的工业反应中, 使用的酶浓度都很高, 同时同样多的底物是以酶-底物复合物形式存在, 这就出现了困难。如果平衡常数很高, 可以认为反应会进行完全; 然而如果平衡常数比较低, 如葡萄糖异构酶催化的葡萄糖和果糖间的反应, 需从反应器的流出物中将所需产物不断分离出来, 而后将剩

余的底物循环反应，以便达到足够高的转化程度。如果涉及两种或更多种底物，只有按正确无误的化学计量比例供给反应器，它们才有可能一次通过反应器达到完全转化。如果其中一种反应物比其他反应物便宜得多，那么可供过量的这种反应物以便最大限度利用比较贵的反应物是可取的。

如果发生逆向酶催化反应，特别是达到从底物向产物的高转化时，更可能发生逆反应，其机制为：



正向反应的速度方程可用正向和逆向反应的米氏常数 (3.21) 来表示：

$$v = \frac{V_{\max}(S - P/K_{eq})}{K_m(1 + P/K_{m'} + S)} \quad (3.21)$$

这里 K_m 和 $K_{m'}$ 分别为正向反应和逆向反应的米氏常数， K_{eq} 为平衡常数，按霍尔丹 (Haldane) 关系式表示：

$$K_{eq} = P_{eq}/S_{eq} = V_m \cdot K_{m'}/V_{m'} \cdot K_m \quad (3.22)$$

其中 P_{eq} 和 S_{eq} 分别为平衡状态下的产物浓度和底物浓度。 $V_{m'}$ 为逆反应的最大反应速度， $K_{m'}$ 为逆反应的米氏常数。

在塞流式反应中，时间-转化公式可综合 (3.21) 推导出

$$V'_{\max} \cdot t = \frac{K_{eq}(K'_{m'} - K_m)}{K'_m(K_{eq} + 1)} S \cdot X - \frac{K_{eq}[K_{eq} \cdot K_{m'}(K_m + S) + K_m(K_{m'} + S)]}{K_{m'}(K_{eq} + 1)^2} X \ln(1 - X - X/K_{eq}) \quad (3.23)$$

(Yamamoto 等, 1977)

注意，当酶-底物复合物分解是可逆时，在酶用于逆反应时，即使在平衡时通常测不出“产物”，也有可能得到瞬间的高浓度“产物”，它取决于正向和逆向反应的 K_m 和 V_{\max} 值的相对大小 (Kashe 和 Galunsky, 1982)。

3.19 效率因子

固定化酶的活性通常是用每克固定化酶或固定化细胞在一小时内催化产生的产物克数,或单位时间每毫升反应器体积形成的产物的克数表示。

影响酶内在性质的各种因素的综合效应用效率因子表示,有时就指偶联效率或活性收率。效率因子就是固定化酶(或细胞)的活性与相应同等量的游离酶(或细胞)的活性比。测定必须在同样条件下进行。静态效率因子(η)是在初始速度条件下测定的,因此是在与底物浓度(即过量底物)有关的零级反应动力学条件下比较游离酶和固定化酶活性的。操作效率因子(η_0)是在生产设备所需或预期的条件下测定的,因此通常是在一级反应动力学条件下测定,因而酶活性受到可利用的底物量的限制(限制作用是由于底物须要达到完全转化成产物,因此底物浓度最后必须趋近于零所产生的)。固定化酶制剂实用上最有用的是操作效率因子。当所得的效率因子值为1.0时,说明固定化作用和扩散阻碍作用没有明显减少酶或细胞的活性。如果所得的值小于1.0,说明总活性损失。这是固定化作用过程,扩散限制程度和其他不利的分配效应等使酶活性造成损失的总和。因此,在使用昂贵的或稀有的酶时,获得高效率因子值是很重要的;也可以使用廉价、来源丰富的酶,通过用酶的高载量,得到底物的高转化率。在有些情况下效率因子可能会大于1.0,它们是(i)当固定化细胞自溶时,使胞内酶可以更有效地作用它们的底物;(ii)固定化细胞制剂内出现细胞增殖;(iii)从载体上也是从酶所处的环境中选择地排除掉抑制剂;(iv)反应为放热反应,再加上载体颗粒内的热传递受限制使载体颗粒的温度升高,

从而使酶活性增加；(v) 固定化酶活性往往比相应的游离酶稳定，因此固定化酶使用一段时间之后再测活性需要比相应的游离酶活性高得多。

Damköhler 和 Thiele 模数是个无量纲数、它表示固定化酶或细胞附近的最大 (V_{\max}) 酶反应速度与最大底物传递速度之比。其值表明影响固定化生物催化剂的有效活性有哪些因素，并可表明酶可能达到的最大活性的差别是多少。在稳定态条件下，底物反应速度必须等于底物传递到酶或细胞的速度，因此 Damköhler (Da) 可定义为：

$$Da = \frac{[S_b] - [S_s]}{[S_s]} \quad (3.24)$$

Da 等于 1.0 (Kashe, 1983)。当 $Da > 1.0$ 时，由于酶活性高，而且底物扩散受限，或两种因素都有，这在透过固定化生物催化剂颗粒时形成一个陡峭的浓度梯度，因此使整体底物溶液的浓度 $[S_b]$ 和细胞表面或酶表面的底物浓度 $[S_s]$ 之间有很大差别，即反应受到扩散作用或传质控制。

相反，当 Da 小于 1.0 时，反应速度仅取决于固定化生物催化剂的活性， $[S_b]$ 和 $[S'']$ 之间的差别可以忽略，就是说这个系统是受控反应。

按作图法，用表观反应速度对以可能的最大反应速度 (V_{\max}) 函数表示的表观活性作图，在 $Da = 1.0$ 时图中的表观反应速度增加，然后在 $Da > 1.0$ 的整个范围内均以同样值继续保持平稳状态。如果 $[S_b]$ 已知，从上述 Da 的定义可以计算出 $[S_s]$ 值 (Kashe, 1983)。

3.20 稳态动力学

对于一个底物扩散系数与底物浓度无关，酶均匀分布于

载体表面并且所有酶分子具有相同活性的系统,底物转化的速度等于稳态时底物的反应速度,即

$$e_m K_L (S - S_s) = \frac{V_{\max}^s S_s}{S_s + K_m} \quad (3.25)$$

这里 V_{\max}^s 为单位外表面积的最大反应速度, V_L 为液体传质系数 (cmS^{-1}), S 为整体溶液的底物浓度, S_s 为颗粒表面的底物浓度, a_m 为单位体积的表面积 (cm^{-1})。

当酶均匀固定在球型载体内部,并且不发生底物分配,以及固定化酶颗粒内温度和压力梯度尚未建立时,酶反应速度是由底物分子的扩散速度所支配的,可由 Ficks 定律来描述:

$$\frac{dS}{dx} = D \quad (3.26)$$

D 为测得的底物扩散系数, x 为距载体中心的距离。因此当达到稳态时,底物消耗速度等于通过每个连续的迁移区域中底物流量并受其限制,固定化酶的动力学可用下式描述:

$$\frac{d^2S}{dx^2} + \frac{2}{x} \cdot \frac{dS}{dx} = \frac{V_{\max}^v \cdot S}{D(K_m + S)} \quad (3.27)$$

这里 V_{\max}^v 为单位体积载体的最大酶活性,而 x 为底物分子必须通过的距离。

固定化细胞的动力学通常也可用上述同样方法处理。然而,固定化完整细胞的动力学性质由于下面一些因素而变得更复杂,即固定化后细胞可能增殖;存在着对底物和产物的外加的(细胞壁或细胞膜)扩散障碍;存在能使某些大分子(如糖类)转移到细胞内的称为透性酶(permeases)的主动转移系统。包括氧在内的大多数分子的移动是通过扩散作用,因而受 Ficks 定律支配,但营养物的主动传送可用米氏(Michaelis-Menten)型关系式来描述。常常需要对固定化细胞进行

透性化处理,以便有利于底物传递。有时透性作用也会受到固定化作用的影响,特别在使用不太温和的固定化方法的情况下更是如此。例如将具有天冬氨酸酶活性的大肠杆菌细胞,固定在聚丙烯酰胺凝胶中可使之透性化。更常见的是,必须用外加步聚专门进行透性化处理。例如用有机溶剂处理生产葡萄糖-6-磷酸的奶油无色杆菌 (*Achromobacter butyrii*) (Murata 等, 1979), 在生产苹果酸时用胆酸盐处理产氨短杆菌细胞 (Yamamoto 等, 1977)。然而用固定化生长细胞进行反应,除有反应必需的底物外又需供给营养物时,要对固定化细胞系统作简单精确的动力学描述就比较困难。生长的固定化细胞与传统发酵中所遇到的情况近似。

单一代谢中的细胞或酶的模型由包括围绕在它们外面的同心传递区带组成。如果底物完全是由扩散作用进行传递,并假设为单向流动,不存在分配效应,那么由扩散作用引起的底物流量可用 Ficks 定律描述。因为可以把细胞或酶看作底物渗坑,活性可降到把各单一步骤的速度常数归纳为系数的米-曼氏动力学形式。这是因为速率受限制的反应决定着全部代谢途径的动力学。因此,当固定化生物催化剂连续使用时,会达到平衡状态。

此模型适合于像氧这样的较小分子。对于较大的底物,特别是像作为碳源使用的较大分子底物,则是通过透性酶转移的,微生物为两个同心传递区带所包围,通过外层区带的传递是有扩散作用控制的,而通过内层区带的传递则有透性酶调控(以细胞贮存的能量作动力)。整体溶液中的底物浓度不影响透性酶调节传递,但可用米-曼氏或兰米尔 (Langmuir) 等温型关系式描述 (Cohen 和 Monod, 1957)。在达到稳定态时,细胞消耗底物的速度等于通过每个连续传递区带的底物流量,并受此流量限制,为此

$$a_m \left(-D \frac{ds}{dx} a_m \right) = a_p \left(\frac{\alpha_p [S']}{\beta_p + [S']} \right) \\ = V_R \left(\frac{\alpha R [S'']}{\beta R + [S'']} \right) \quad (3.28)$$

这里 $[S']$ 为透性酶作用区带外部底物浓度, α_p 和 β_p 为系数, a 为透性酶作用区带外部面积, $[S'']$ 为代谢区带内的底物浓度, D 为底物扩散系数, 而 ds 和 dx 分别表示底物区带和单个微生物的体积。

假设细胞团的功能和生物学性质不随时间变化, 就可能建立固定化细胞制剂的差示质量平衡, 这时底物传递速度等于细胞消耗底物的速度和产物生成速度, 即

$$D_e \left(\frac{d^2 S}{dx^2} \right) - \frac{a' \alpha S}{\beta + S} = 0 \quad (3.29)$$

这里 a' 是单位体积的固定化细胞颗粒内有生存能力的微生物的外表面积, α 代表 α_p 或 $\frac{\alpha_m V_m}{\alpha_m}$, β 是速度方程系数。当 $x = L$ (固定化细胞制剂厚度) 时, $dc/dx = 0$, 而当 $x = 0$ 时, $S = S'$ (Atkinson, 1974), D_e 代表在扭曲颗粒孔内的有效分子扩散系数, 它反映出底物与载体材料间的氢键介导的相互作用以及底物和载体间的空间阻碍。

然而, 包埋细胞的增殖使情况变得复杂, 常会造成固定化细胞制剂的机械强度降低, 在少数情况下颗粒甚至破碎。虽然固定化细胞的浓度会增加, 但新生细胞不均匀地分散在载体中, 因此引起扩散阻力增加。

产物从固定化细胞制剂出来所遇到的问题和底物进入细胞所遇到的问题很相似。然而在许多情况下, 当细胞的化学渗透完整性遭到破坏时, 细胞代谢中间产物的漏出就会明显增加。

如 在 多 相 系 统 中 存 在 扩 散 限 制 作 用 的 固 定 化 酶 一 样 , 对 固 定 化 细 胞 活 性 抑 制 作 用 会 影 响 酶 的 固 有 活 性 和 底 物 的 消 耗 速 度 , 于 是 ,

$$v'' = \eta \frac{V_{\max} S}{K_m + S} \quad (3.30)$$

这 里 的 η 为 存 在 抑 制 剂 时 的 效 率 因 子 , 而 v'' 为 有 抑 制 剂 存 在 下 的 反 应 初 速 度 。 这 样 , 在 底 物 中 低 浓 度 供 给 或 在 酶 催 化 的 反 应 中 产 生 的 化 学 抑 制 剂 会 因 扩 散 限 制 而 受 到 掩 盖 。 因 此 扩 散 限 制 和 化 学 抑 制 作 用 通 常 同 时 起 作 用 。 它 们 的 综 合 作 用 比 单 独 作 用 的 总 和 要 小 , 而 且 在 严 重 的 扩 散 限 制 作 用 下 会 掩 盖 抑 制 剂 的 作 用 。 这 种 影 响 会 表 现 出 来 , 造 成 固 定 化 细 胞 活 性 逐 渐 降 低 。 当 使 用 多 孔 载 体 材 料 时 , 颗 粒 外 部 的 活 性 首 先 损 失 , 然 后 位 于 颗 粒 内 部 的 细 胞 逐 渐 失 活 。 在 底 物 中 以 低 浓 度 提 供 , 或 在 酶 催 化 反 应 中 产 生 的 化 学 抑 制 剂 , 因 扩 散 限 制 的 存 在 而 受 到 掩 盖 , 因 为 假 若 受 抑 制 的 酶 占 总 酶 活 性 比 例 不 大 , 会 由 于 扩 散 的 限 制 作 用 而 表 现 不 出 来 。

3.21 酶的固有活性——修饰因子

3.21.1 引言

酶 在 固 定 化 时 和 固 定 化 后 引 起 其 固 有 催 化 性 质 改 变 主 要 有 六 种 因 素 。 在 用 固 定 化 酶 催 化 的 多 相 催 化 反 应 中 , 速 度 不 是 简 单 的 由 pH、温 度 和 底 物 溶 液 等 主 要 因 素 决 定 , 而 是 由 质 子 、热 及 底 物 通 过 载 体 向 固 定 化 细 胞 或 酶 传 递 的 速 度 决 定 的 。 在 固 定 化 酶 载 体 内 大 分 子 的 扩 散 会 明 显 地 受 到 载 体 基 质 内 空 间 位 阻 相 互 作 用 的 限 制 , 发 现 固 定 化 酶 对 高 分 子 量 底 物 的 活 性 通 常 要 低 于 低 分 子 量 底 物 的 活 性 。 例 如 , 固 定 化 的 蛋 白 酶 对 低 分 子 量 人 工 合 成 底 物 活 性 高 , 而 对 高 分 子 量 的 天 然 底 物

(如牛血清蛋白)的活性要低得多。

酶的内在动力学是指可溶酶的动力学,在有修饰因子和无修饰因子的情况下,固定化生物催化剂的动力学分别称为有效动力学和固有动力学。

主要因素有:(a)构象效应,是由于固定化时对酶蛋白的化学修饰作用引起的。当修饰的氨基酸是组成活性部位的一部分,或者是对保持酶的三维结构十分重要时,这种效应对酶活性有特别严重的影响。(b)空间效应,常常是由于酶分子固定化在相对于载体表面的位置而出现的,这样使酶的活性部位对底物分子来说是较难接近的。(c)微环境效应,这

是由于固定化酶处于与整体溶液完全不同的物理环境中产生的。分配效应通常是由微环境效应引起的。例如,亲水底物会有选择地吸着在亲水载体的表面或孔内,使底物的局部浓度增加;而疏水底物会被亲水载体排斥,但会有选择地吸着在疏水载体上,具有对邻近载体的底物局部浓度有类似的效应(图 3.10)。同样,带正电荷的底物和质子会吸在带负电荷的载体上,使局部底物浓度增加及载体内的 pH 降低,还有许多载体的内部相对来说是厌气的,

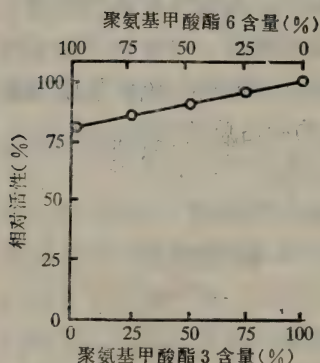


图 3.10 凝胶疏水性对聚氨基酸酯包埋细胞的相对水解活性的影响 (PU-3 为疏水凝胶, PU-6 为亲水凝胶)。反应是在含有 39 mmol/L 的 dl-琥珀酸甲酯的水溶液和的正庚烷中进行的 (Omata 等, 1981)。

这是由于载体上的带电荷基团作用会使气体“盐析”出来。

这样的分配效应使固定化酶的最适 pH 和 K_m 值不同于用游离酶所得的值。在底物带正电荷、载体材料带负电荷的

情况下,固定化酶的 K_m 会减小,而最适 pH 会向更碱性 pH 方向移动。若使用带正电荷的底物分子和带正电荷的载体时,显然会有相反的效果,即最适 pH 向更低 pH 方向移动, K_m 增加。因为细胞常带有负电荷,会引起固定化细胞酶活性的最适 pH 和最适底物浓度的变化,因而经常发生分配效应。如固定化在阴离子交换树脂上的大肠杆菌细胞和敏捷固氮菌 (*Azotobacter agilis*) 细胞的最适 pH 要比悬浮液中的同样细胞的最适 pH 高些 (Hattori, 1973)。这种变化可能是不利的,但常可加以开发利用,使以往无法使用的操作得以应用。由于固定化细胞的酶不与载体的微环境直接发生相互作用,因此这种类型不会有构象效应和空间效应。

由于反应发生之前,底物必须扩散到固定化酶,因此发生扩散限制作用。扩散作用 (Fick 定律描述的) 和酶反应是同时发生的,这样在固定化酶颗粒内部(和周围)形成底物和产物的浓度梯度,在使用高活性酶时这是很重要的。最初达到平衡时形成的梯度是不规律的,然而,一旦建立起稳定态,总是会有梯度的存在。

3.21.2 扩散限制作用对固定化生物催化剂活性的影响

扩散限制作用可分为内扩散效应和外扩散效应,并可以用皮克里特准数 (Peclet number) N_{pe} 定量描述,因此当 $N_{pe} > 1.0$ 时,流体(底物)出现整体流动,正如大管道中心部分的液流那样;而当 $N_{pe} < 1.0$ 时,扩散是主要的。因此 N_{pe} 值越低,由扩散作用而不是整个液体流动所传送的底物分子的比例就越大。整体流动的详细公式如下:

$$(jB) = V \times C \quad (3.31)$$

而扩散速度为

$$(jD) = -DdC/dx \quad (3.32)$$

这里 V 为流速, C 为浓度。而

$$N_{pe} = \frac{jB}{jD} = \frac{V \times z}{D}$$

简言之,皮克里特准数是整体传送与分子扩散传递的比。

3.21.3 外扩散限制

在每个载体颗粒周围混合差的液体薄膜(能斯特-布兰克层, Nemst-Plunklayer) 中,底物的扩散速度引起了外扩散限制作用。在充分混合的反应器内,增加搅拌程度可以减小但不能避免外扩散限制作用。在管式反应器内可以采用增加流速的方法;或用更浓的底物或粘度较低的底物的方法减小外扩散限制(Horvath 和 Engasser, 1974)。扩散效应往往会使形成稳定态之前所需的停滞时间延长,因为在发生反应之前,底物分子必须扩散通过整体溶剂,再通过载体颗粒周围的混合不良的溶剂膜及载体的微孔,然后进入固定化的细胞内。而在整体溶剂中能检出和监测产物之前,产物分子同样也须经过相似程度的但方向相反的扩散途径。

3.21.4 内扩散限制

内扩散限制是由于载体的孔径小(和弯曲)引起的。在正常操作压力下它会防止流体在颗粒孔内的强制流动。因此测到的扩散系数值要比游离溶液所测得的值低些,这样,

$$D_e = \frac{D\psi}{\tau} \quad (3.33)$$

这里 D 是游离溶液中测得的扩散系数, D_e 为在载体颗粒内测得的有效扩散系数, ψ 是颗粒的孔率,而 τ 为曲折因子,它表示在颗粒内底物分子在两点间扩散必须走过的距离。作为一般规律,有效扩散系数是与载体的水含量成正比而与底物分

子量成反比。

采用薄膜状固定化酶可部分地防止这种内扩散限制发生。这是由活性酶层包裹着无催化活性的核,这种核用来增强颗粒的机械强度。遗憾的是这种类型的固定化酶能得到的酶活性相当低。然而也有一个好处,即酶附近范围的 pH 在某种程度上是可以控制的。

高载量的固定化酶也会产生内扩散限制,因此并不是所有被固定化的潜在酶活性都表现出来,一部分成为潜在活性。这是因为位于载体颗粒外层部分的酶分子消耗了进入颗粒的大部分,甚至是全部的底物,而处于颗粒较深部的酶分子很少有机会与底物作用。即使在低浓度固定化生物催化剂存在下也只出现低内扩散限制,但当用较高浓度固定化生物催化剂时,可能出现显著的限制。因此需要用试验来决定最适的固定化生物催化剂的载量。

用 Thiele 模数 (ϕ) 可以定量描述影响内扩散限制程度的有意义的变量。

$$\phi = L\lambda = L \sqrt{\frac{V''_{\max}[E]}{K''_m D_e}} \quad (3.34)$$

L 为颗粒的半厚度, $[E]$ 为颗粒内的酶含量, V''_{\max} 和 K''_m 为固定化酶动力学参数。对于片状或板状固定化酶, $\phi = L\lambda$ 。对于圆筒状固定化酶, $\phi = r/2\lambda$, 对于球型固定化酶 $\phi = r/3\lambda$, 这里 r 为颗粒半径。因而, Thiele 模数与所研究的酶分子中心活性成正比, 即与每秒钟每个酶分子转化的底物分子数成正比; 与载体提供给底物分子的扩散途径成正比; 与酶对底物的亲和性成正比, 这当然是以酶在载体颗粒内均匀分布为前提。当 ϕ 大时, 固定化生物催化剂的效率因子低, 而当 ϕ 接近于零时, 效率因子趋近于 1 (Wang 等, 1979)。

如果固定化酶制剂活性随载体颗粒的减小而增加, 尤其

当固定化酶破碎成很小颗粒时,即底物分子扩散距离大大减小,活性增加更明显的情况下,存在内扩散限制。内扩散限制也可根据反应的表现活化能的降低来测定,由于固定化细胞颗粒一般比相应的固定化酶颗粒大得多,可料想到内扩散限制是影响固定化细胞活性的主要因素。如果改变固定化酶柱长度,而仍保持底物在反应器中存留时间恒定不变,使底物变成产物的转化程度发生变化,也能显出内扩散限制。另一种确定孔扩散效应的方法是比较温度对游离酶和固定化酶活性的影响。如果固定化酶的阿雷尼厄斯图(等温线图)是直线并

且斜率等于可溶酶的斜率,那么就不存在扩散限制,因为在较高温度下一般会使斜率降低。

用下面一些办法可把内扩散限制降到最低限度:使用低分子量底物,高底物浓度,低生物催化剂浓度,高孔率载体,而且孔要尽可能大,尽可能不弯曲,不互相连通,把酶只固定在载

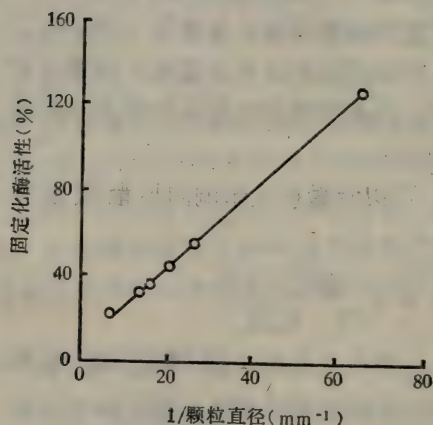


图 3.11 固定化在颗粒大小不同的磁面上的胰凝乳蛋白酶的直径与酯化活性的关系 (Monroe 等, 1977)。

体表面,更重要的是使用尽可能小的颗粒(图 3.11)。理想的是应当使用相对于游离酶或细胞,大小相当于零的颗粒!有时增加表面积与体积比是有好处的,可使底物更容易扩散到颗粒内部,但在搅拌反应器内形状不规则小的颗粒更易磨损,在固定床式反应器内可能产生不稳定流动和压实,尤其颗粒大

小差别很大时更为严重。

因此,在具有低效率因子的极高活性固定化制剂与具有较高效率因子的活性稍差的固定化制剂之间可以进行折中。确实,在整个颗粒中的效率因子是不同的,靠近颗粒表面的效率因子高,接近颗粒中心的较低;而且沿着固定床式反应器的长度而变,靠近柱入口处较高,接近出口处却较低。

已发现,扩散限制部分强调酶抑制剂的抑制作用不够,因而扩散限制和抑制作用的联合效应比两者单独作用的总合要小。另外,存在于底物中的抑制剂,它首先会抑制最先遇到的酶分子,这些通常是位于载体表面上的酶分子和填充床柱入口处的酶分子。然后是对位于越来越深入到颗粒内的酶依次抑制(也沿着柱方向进行)。

除了对固定化生物催化剂有传质扩散限制以外,有时热量和气体传递限制也是重要的。例如,当放热酶反应是在传质速度很低的大型反应器内进行时,产生的热量不能有效地散发,会使温度明显升高,继而由于热变性作用使酶活性降低。

由于氧在水溶液中溶解度低,氧传递限制作用常严重地影响需氧反应的速度,包括细胞和需氧酶催化的反应速度,特别是使用高催化剂密度,而且细胞和酶以固定化形式利用时更为严重。有几种方法可用于解决这个问题,包括氧的原位再生。例如加入过氧化氢和过氧化氢酶(Holst 等,1982)或与产氧的藻类共固定化。当然可以使用氧的溶解度比水高的溶剂,如四氯化碳(Buckland 等,1975)或全氟化物(氟利昂)(Acllercreuz 和 Mattiasson, 1982),只是前者存在安全问题,后者又太昂贵。

最后,在固定化光合细胞或细胞器的情况下,对固定化活性的限制作用会有较特殊的形式,即光能否容易传导到载体

颗粒内部。有两种效应存在，一种是比较接近于表面的细胞对深埋在颗粒中的细胞有明显的自身屏蔽作用。载体材料的光传导性质也起很重要的作用，如果这种材料内能将光线反射到颗粒深处的细胞上那是有利的。

3.22 辅因子再生

如前所述，需能反应通过与高能辅因子如 NADH、NADPH、辅酶 A 或 ATP 偶联，方能进行下去。反应产生的 NAD、NADP、AMP 和 ADP 必须进行再生，以便维持这些反应正常进行，因为这些辅因子太贵而不能连续供给。在完整细胞内，再生是与底物水平及细胞色素参与的放能反应有关的细胞代谢过程的一个方面。在使用分离出来的酶和破碎细胞时，再生是个非常重要的问题，因此这样的催化剂一般只局限于降解和异构化反应。

看来 ATP 是一种再生比较简单的辅酶。Banghn 等 (1978) 采用一种新型缩合共聚反应将三种不同酶固定化，用在循环的 ATP 再生系统，并研究了与 ATP 再生偶联的各种有机合成 (Wong 等, 1981)。Marata 等 (1981) 在生产谷胱甘肽时使用了固定化酿酒酵母细胞再生 ATP (图 3.4)。Marshall (1973) 使用固定化在戊二醛活化的氨烷基玻璃上的由粪链球菌产生的氨甲酰基磷酸激酶从 ADP，及由氰化钾、磷酸钾衍生的氨甲酰基磷酸酯再生 ATP；而其他研究者使用肌酸酐激酶、磷酸果糖激酶和面包酵母在聚两性凝胶中的共固定化从 ADP 或腺苷连续再生 ATP。

还原型吡啶核苷酸再生是个很困难的问题，由于它需要很高的精确度，而且工艺过程要便宜、有效，以便适于工业生产上作定向合成。Wykes 等 (1975) 使用游离和固定化醇脱

氢酶和乳酸脱氢酶于酶反应器内进行辅酶循环,但由于辅酶稳定性较差而受到限制。同样,NADPH 已用葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Wong 等,1981 a、b),或固定化叶绿体再生(Karube 等,1980); NAD^+ 和 FMN 也可用真养产碱菌(*Alcaligenes entrophus*) 细胞和氢气再生(Klibanov 和 Puglisi, 1980),在连续反应器内使用 L-亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶已把 NADH 共价结合在聚乙二醇上(Wichmam 等,1981)。另一种方法是在可流通的系统中使用能进入透性化细胞内,并能再生的 NAD 和 ATP 的水溶性聚丙烯酰胺衍生物(分子量为 5—10 000)(Mosbach,1978)。Chang 等(1982)使用类似的 NAD/NADH 葡聚糖衍生物,这些衍生物是包裹在人造微囊中。一种比较特别的方法是将醇脱氢酶和通过空间臂结合在同样载体上的 NAD^+ 类似物共固定化,当它们将乙醇转化为乙醛,乳醛转化为丙二醇时,即可连续再生(Lejoy 等,1980)。同样,也已把醇脱氢酶和肌醇-1-磷酸合成酶与 NAD^+ 共固定化, NAD^+ 通过进入邻近的酶活性位点以另一种方式进行连续再生。这样, NAD^+ 实际上更像辅基而不像辅酶(Mansson 等,1978,1979)。

酶也可用来实现利用辅因子的其他反应,比如用产氨短杆菌完整细胞的 NADP 激酶使 NAD 能够转化为 NADP(Hayashi 等,1979; Murata 等,1981)。它的优点是使细胞透性化以利于磷酸盐进入细胞,细胞具有 NADP 合成活性,半衰期为 8 天。

3.23 生物化学反应器

3.23.1 引言

酶反应器基本上是游离酶,固定化酶或固定化细胞催化

反应的容器(附上混合、取样和检测设备)。反应器的作用是以尽可能低的成本、按一定的速度由规定的反应物制备特定产物。酶反应器不同于化学反应器,它是在低温、低压下发挥作用,反应时的耗能和产能也比较少。酶反应器不同于发酵在于不表现自催化方式,即细胞生长的连续再生。正如化学反应器那样,酶反应器也是根据它的产率和专一性来进行评价的。

反应器分为均相和非均相两种。这取决于反应器内含物

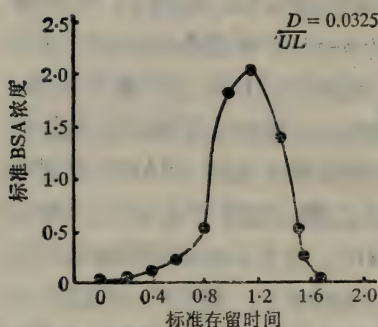


图 3.12 填充柱床式反应器的存留时间分布图。牛血清蛋白作为示踪分子上柱 (Ghore 和 Chand, 1978)。

是否均一,均相反应器内只有一相,而非均相反应器内有两个以上的相。非均相反应器内一般含有连续的液体底物相和非连续的固定化催化剂相。反应器也可按其他方法分类,比如反应是以批式还是连续式进行的,反应器是开放型还是密闭型,即使用时催化剂是否流出反应

器。最重要的是按反应器内发生的混合程度来分类,理想的类型是完全混合型和塞流型反应器。不同构型的反应器内的反应物浓度分布图可以相差很大。在充分混合的反应器内,反应物分子处于恒定的搅拌状态,而在塞流式反应器内,流体成分像活塞一样通过,反应器内前后流体成分不发生混合(图 3.12)。因而在批式充分混合的反应器内,反应进行过程中,反应物的组成会改变,但整个反应器内仍恒定。在连续搅拌反应器内,当达到稳定态时,反应器内的各组分是均匀的,并且不随时间改变(在没有酶失活的条件下)。在塞流式反应

器内,反应物的组成不随时间而变化,但沿反应器长度而变化。这些浓度分布可能影响固定化酶的活性和稳定性,例如,内源产生的抑制剂从连续反应器内不断流出,因而一般不会达到临界浓度。因此在塞流式反应器内,效率因子在入口处附近高,而在出口附近要低一些。这是因为底物浓度随反应物通过反应器而降低。在批式反应器中,整个反应器内的效率因子是一致的。然而尽管设计和操作备加小心,实际上只能接近理想的混合类型(多数情况下非常接近)。特别是在填充床柱式反应器内非理想流动是客观存在的,大规模应用时更是如此。

3.23.2 各种类型生化反应器(可见A部分第4章)

除图 3.13 所示的反应器基本类型外,还有比较复杂的环流式反应器,在必须保持大体积生产能力时它有利于底物完全转化,所需的反应器配件,取决于催化的特定反应。选择最适类型的反应器(以及有效的设计和操作)对于工业生产来说是很重要的。

重要的是要考虑到温度和 pH 控制、气体反应物的供给和去除、原料中存在的所需固体颗粒及不希望存在的固体颗粒。另外要考虑的是底物和产物的化学和生物学稳定性。还需要考虑到生物催化剂更换所需的频率。此外除了产物预期的应用外,还要考虑底物和产物是否可能有抑制作用,以及预期的生产规模。

批式、半批式或连续式操作均可在搅拌罐式、薄膜式、多室式、填充床式、扩充床式或流动床式反应器中进行,其中最常使用的是恒流速的填充床式反应器和批式搅拌反应器。薄膜反应器包括中空纤维和超滤反应器。反应器连续操作在经济上是合算的,特别是需要大量产品产量的情况下更加有利,

反应器类型

图示

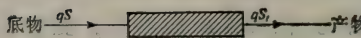
描述特性的方程式

批式



$$XS \cdot K_m \cdot \ln(1-X) = \frac{kE \cdot t}{V}$$

管式
(塞流式)



$$XS \cdot K_m \cdot \ln(1-X) = \frac{kE}{q} = \frac{kE \cdot t}{V}$$



$$XS + K_m \cdot \frac{X}{1-X} = \frac{kE}{q}$$

连续搅拌

图 3.13 普通反应器的图示和数学描述。公式是从作用单一底物，且无抑制作用的酶反应推导出来的。X 是底物转化比例， kE 是反应器内的总酶活性， S 和 S_i 是初始和终末底物浓度， q 为底物进入反应器的流速， t 为工作时间， K_m 为米氏常数， V 为反应器的工作体积。引自“生物技术原理” (Wiseman, A, 编) Surrey 大学出版社, Glasgow and London, 1983。

因为投资少,劳务成本低,并且恒定的操作最容易控制和实现自动化,但是催化剂更换和再生比较困难。单位反应器体积的活性很重要,因为这个参数决定了达到一定生产率需要的反应器的大小,它也影响操作因子,比如床压力。根据反应器体积计算活性时,填充床反应器要比搅拌反应器优越,因为后者的颗粒催化剂可能仅占总反应器体积的 10%。

必须考虑的是:原细胞或酶的酶活性;每升载体材料的固定化细胞或固定化酶重量;固定化后保留的活性;扩散作用对固定化酶或固定化细胞的工作活性的影响;固定化酶或固定化细胞的稳定性;反应物的稳定性,产物产量和纯度、安全性和其他操作条件。例如,当需要气体充分混合,有效地进行 pH 和温度控制,需要用高流速,或底物中含有不溶性固体时,流动床和搅拌反应器特别优越,但不能使用易碎的载体材料,非锥形流动床反应器仅能在窄小的流速范围内使用。温度、

pH、底物浓度、反应器运转时的转化等的最后的选择取决于底物、劳务、管理等运转成本，及包括设备的投资费用等在内的经济评价。

3.23.3 生化反应器性能的评价(见图 3.13)

评价一种反应器性能应在模拟原生产条件下进行，从中反映出良好的加工制造质量，性能的测试是通过酶活性、稳定性、选择性、达到的产物产量、底物转化为产物的程度、使用的反应物浓度等来衡量的。

人们的目的是使用尽可能小的反应器尽快地达到一定的生产效率，这样，使工艺运转成本和投资减到最小。如果底物或产物不稳定(或生成副产物)，使用高酶活性是必不可少的。如果反应物在反应器内存留时间尽量缩短，这个问题就可减小。酶活性一般是用容量表示的，如按运转单位时间(小时)、单位反应器体积(升)形成的产物重量(克)表示 (g/L/h)，也可用类似的术语表示。容量活性取决于反应器中固定化生物催化剂浓度和固定化生物催化剂活性。固定化生物催化剂的活性又是由所采用的游离生物催化剂活性、载体材料截留的生物催化剂量、固定化后保持的活性比例、扩散效应和分配效应的程度等所决定的。注意，因为通常要求底物转化成产物的程度高，往往需要使用 K_m 值低的酶，即优选对底物亲和力高的酶，以便在达到接近临界转化程度，剩下的底物浓度已很低时，还能保持较高的酶活性。

为了减小反应器体积和反应物在反应器内的存留时间，在酶反应器中要使用高浓度酶。固定化酶和固定化细胞的半衰期(操作稳定性)是按反应器的活性值衰减到原活性值一半所需时间表示的。由于颗粒内和颗粒间的扩散限制作用，稳定性可取决于初始活性(效率因子)。生物催化剂稳定性(半

衰期值)应该高,以便使酶的生产和固定化只需要隔一段时间进行一次。

反应器的生产效率取决于酶的活性、稳定性以及达到的产物产率。在使用固定化细胞或固定化酶时,常发生多级反应而产生不需要的副产物,这些副产物可能是因产生的产物发生了进一步代谢,或是另一种酶或一群酶代谢掉部分底物或通过更复杂的机制造成的化学变化所致。可能副产物也是有用的,而且易纯化并可出售,但目的在于通过仔细选择结构适当的反应器和反应器条件来中止副产物的形成或使它们的形成降到最低限度,因为这些副产物可能起酶抑制剂或变性剂的作用。要注意,使用高浓度底物的结果之一是,通常认为不是某种酶的底物的物质却成了底物,这是由于接近酶对它们的高 K_m 值,因为正常情况下,它们与酶结合很弱,酶是不作用这些物质的。

反应产率既可用相对产率也可用操作产率表示。相对产率表示参于反应形成产物的底物分子的百分数。此参数随转化的增加而急剧降低,而操作产率是进入反应器并经反应形成产物的底物分子的百分数。

反应选择性的定义为形成所需产物的分子数除以转化成非需要产物的底物分子数。存在回混反应时,如在搅拌罐反应器中,由于产物与反应物混合,以及反应物浓度降低,反应的选择性也降低。然而在管式反应器中,由于接近于理想塞流式,产率和选择性均最高。选择高的反应很有价值,因为原料的利用最有效、最经济,特别是可在保持底物转化成产物最高转化的条件下可获得相当不错的产物产量。杂质的减少有助于所需产物的分离纯化。只要有可能,使用纯酶和纯的底物,以及减小反应器内的非理想流动有利于选择性反应。若能使用高浓度反应物,对产物分离也是有利的,特别是生物催

化剂选择性高而不可逆时更加有利。回收前必须除去的溶剂
量也大大降低。

由固定化细胞或固定化酶形成产物的速度可用容量法表示,例如用克(产物)/(升)反应器体积/小时(反应时间)表示。

$$\frac{\text{流出液中产物浓度}^* \times \text{流速}}{\text{反应器体积}} \quad (3.35)$$

或用容量活性对工作时间作图的积分面积表示,而且与在一定时间(t)内底物通过反应器的流速(q)有关,也可用下式表示:

$$\text{生产效率} = \int_0^t q dt$$

当活性呈指数衰变和保持恒转化时可表示为:

$$\text{生产率} = \int_0^t q \exp - \ln 2 \frac{t}{t/2} dt \quad (3.36)$$

式中 q 为初始底物给料速度, $t/2$ 为酶活性半衰期(Pitcher, 1978)。

监测反应器的材料或质量平衡也是重要的。通常处于稳态工作的反应器中的材料积累速度为零。然而当底物或产物易挥发或不稳定时,会有一些损失。过渡态,即反应器启动到达到平衡之前为:

$$\begin{aligned} & \text{进入反应器的反应物流速} - \text{流出反应器的反应物流速} - \\ & \text{通过反应除去反应物的速度} = \text{反应器内材料积累速度} \end{aligned} \quad (3.37)$$

对于批式反应器,前两项为零,而产物积累速度或反应物消失速度等于反应速度。对于连续管式反应器或连续搅拌反应器

* 或流入与流出物流之间的浓度差。

来说,在反应器中不应有材料积累,因此反应物的除去速度是由流入速度和流出速度差来平衡的。

也可监测反应器内的热平衡,但因为酶反应一般不与大量的能量输入和输出相关,这个参数不如在许多化学反应中那样重要。对任何已知反应物,在稳定状态时:

$$\text{热输入速度} = \text{组分输入速度} \times Q \text{ (发生反应的单位组分产生的反应热)} \quad (3.38)$$

利用淀粉葡萄糖苷酶进行的这些效应的实用研究采用填充床式反应器,可见 Marsh 和 Tsao 的报告(1976)。应注意:由于酶对热相当不稳定,酶反应中热传递可能是重要的,例如固定化载体是热的不良导体,可使酶处在高于整体溶液温度的环境中。

3.23.4 批式反应器

批式反应器是传统形式的反应器(如酿造工业上使用的),它适合用于可溶酶(图 3.14)(或需要小输出及不经常操作的场合)。它由一个能够进行底物与酶混合的罐组成,一旦达到所需反应程度,立即放出反应器内的内容物。由于反应过程中条件变化,需要比较复杂的控制设备,这是批式反应器的缺点。另外,反应器放大时,要保持反应物很好混合有困难,因为随反应器尺寸增加,不可能确保按比例输入功率。另一个问题是批与批之间产品质量有差别;每批反应间的“停机时间”的损失;批式要比连续式需要更多的维修和辅助设备;以及投入更多的劳务。酶不能再利用并且在批与批之间回收酶时易于损失(但有可能半连续使用)。尤其当需要高的传质和气体传递时,这些缺点就十分突出。例如,生产 6-氨基青霉烷酸是在内含固定化青霉素酰化酶的批式搅拌反应器中进行的。这就需要在反应过程中连续加碱,以中和反应产生的

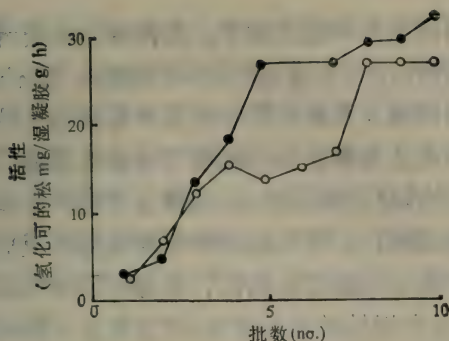


图 3.14 用 2 克固定化简单节杆菌 (*A. simplex*) 细胞以反复批式方式将可的松转化为氢化泼尼松。将固定化细胞在 285 ml pH 7.0 的含 0.5% (w/v) 蛋白胨 (●), 或 285 ml pH 7.0 的含 0.1% 蛋白胨和 0.2% 葡萄糖 (○) 中保温。加入 15 ml 20 mmol/L 的可的松 (溶在甲醇中开始反应。所有可的松完全转化后, 洗涤固定化细胞, 再用新鲜的含可的松的营养物质再保温培养 (Ohlson 等, 1978)。

酸 (Carleysmith 和 Lilly, 1979)。现在, 在工业生产中最常采用的是塞流式柱反应器。在一些酶批式应用 (例如麦芽浸汁或酿啤酒的麦芽汁生产) 中, 反应过程中需要有高酶活性, 但又不能使有活性的酶残留在产物中。一般是可用增加反应器温度来达到, 使最后一些酶分子失活之前消耗掉最后一些底物分子。

3.23.5 连续搅拌罐式反应器

CSTR (回混式反应器) 是一种多用途而又经济的反应器, 对进行液相反应特别有用。反应器内容物充分混合, 因此整个反应器内的反应物浓度实际上是均一的。注意反应器流出物组成与反应器内的反应混合物相同 (底物进入速度和反应器的产物流出速度相同)。

在这样充分混合的反应器内很容易供气 (还有 pH 和温度控制)。搅拌罐内的 pO_2 、pH 和温度可能会有不同, 这取

决于反应器的大小和混合效率。新鲜催化剂要容易加到反应器内,也要允许使用含有颗粒材料的底物,而不致造成阻塞。这种反应器的缺点是为进行有效搅拌需要输入较大的动力。因此,固定化生物催化剂的颗粒可能会出现磨损。另一个问题是,与塞流式柱反应器相比,搅拌反应器中只能保持低固定化生物催化剂浓度。因此使用较小的塞流式反应器就可以达到一定的产物形成速度。然而,实际使用中可能仍选用搅拌反应器,因为大搅拌罐容易制造,并且便宜,容易满足不同的工艺要求。工业生产中使用 CSTR 的实例就是在炼制甜菜糖过程中在 U 型容器内用固定化 α -半乳糖苷酶,除去不要的糖类,每个容器都带有搅拌和筛网,使固定化酶保留在反应器内,糖浆是泵送过反应器的。

当反应物在反应器内存留时间相同时, CSTR 的最大转化总要比相当的批式反应器低。混合得好,似乎搅拌反应器中的反应选择性要比塞流式反应器中的低。然而有一个问题,在搅拌反应中细胞和酶悬液的选择性差,而对产物的抑制作用较敏感,因而要想达到高转化率比较困难。但是在混合良好的反应器中具有比塞流式反应器更能利用底物抑制反应和产物活化的优点。例如,在底物抑制反应的情况下,反应过程中可间歇加入底物,使其浓度不会高到发生明显抑制作用 (Lilly 和 Sharp, 1968)。

将许多搅拌罐联结起来形成一个串联反应器组,可达到有效的混合,类似于塞流式反应器的性能,但比较复杂,费用较高,尚未大规模应用 (Carley-Smith 和 Lilly, 1979)。

3.23.6 塞流柱式反应器(或管式反应器)

这些反应器是由填充有固定化生物催化剂颗粒的柱构成。在动力学上,要比以容积活性为基准的搅拌式反应器有

效,而且简单,易操作,易自动化。大规模连续操作可减少劳力和管理开支,比传统的批式工艺更易控制,有利于生产出质量更可靠的产品。填充柱可以使用高浓度的催化剂。反应过程产生的产物分子和抑制剂可从反应器中不断地流出,产物浓度可减到最低限度,因此减少产物的抑制作用。然而塞流式反应器中的底物抑制作用要比 CSTR 严重。Adachi 等(1981)研究了进行可逆和顺序反应的填充床式固定化酶反应器的脉冲响应。

上行流动操作的优点是流体与颗粒的接触好,柱压降低。在正常大气压下的下行流动操作可用控制床顶部的水力压头控制液流通过床。在下行流动操作中可减少颗粒摩擦和沟流问题,并解决液流在反应器入口部的分布问题。下行流动反应器也可在压力下运行,这样可用于较深的床。在工业生产中,比较受欢迎的反应器设计似乎是以平行方式操作的若干固定床柱,其液流是以下行方式进行的。

填充床柱有自压缩倾向,也有为底物溶液中颗粒物质塞倾向,与批式反应器相比,较难进行卫生操作和添加新鲜生物催化剂。在另一种情况下,即当存在底物抑制作用和产物活化作用时,在动力学上塞流式反应器不如混合良好的反应器优越性高。尽管保持温度和 pH 恒定有困难,管式反应器还是很有用的。另一个问题是有关气态反应物的供给(因此使用循环圈, recycle loops)。

在较高流速下,柱也可按延伸床方式进行操作,因此可避免堵塞和压缩,并可改善传质。另外,使用填充生物催化剂颗粒时可用淋流方式,像一些采用微生物絮凝团处理废水工艺那样。

要注意,在填充床中使用的固定化细胞或固定化酶颗粒的大小要妥善处理,因为小颗粒的扩散限制低,但可压缩性

高,而大颗粒扩散限制大些,但可压缩性低。

3.23.7 流态化床式反应器

在流态化床式反应器内,生物催化剂颗粒处于悬浮状态,

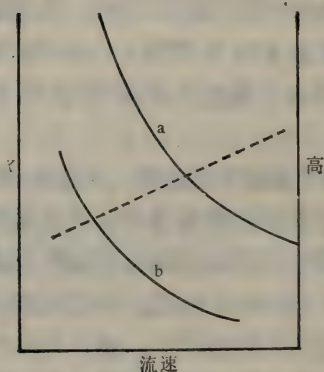


图 3.15 底物通过流态化床的流速对达到的转化程度 x 及流态化床高的影响,用较浓底物 (a) 和稀底物 (b) 绘图(引自《生物技术学原理》,A. 怀斯曼主编, Surrey 大学出版社,1983)。

通过快速上行流动的底物或气体进行混合,因此也可使用含有固体颗粒的底物。使用流态化床时, pH 和温度控制以及气体的供给比较容易。由于流态化床的空隙体积大,催化剂的浓度不可能很高,另一个问题是由于使固定化生物催化剂流态化所需要的高速底物流动可能将催化剂冲出,使反应程度低(图 3.15)。使底物进行循环是避免催化剂冲出使底物完全转化成产物的一种方法。另一种方法是使用几个流态化床

组成的反应器组,或使用锥形流态化床。

另外,如果将酶固定化在磁性颗粒载体上,可用电磁场使之维持在静止态 (Sada 等, 1981), 或将磁铁圈安放在反应器的出口处以免生物催化剂流出反应器 (Gelft 和 Boudrant, 1974), 甚至在反应器流速很高的情况下也是有效的。然而, 尽管流态化床有诱人的特性,但由于运转成本高和难于放大,还没有广泛大规模使用。

3.23.8 超滤式反应器

超滤式反应器是一种充分混合的反应器。鉴于超滤膜的

选择性能,可以使用这种类型的反应器分离高分子量和低分子量的反应物,因此在降解高分子量底物的反应中最有用。最好使用可溶性酶,以保证能与大分子底物充分接触。读者可参阅在超滤式反应器内成功使用头孢霉素乙酰酯酶的报告(Abbott 等,1976)。

选择性膜也已在中空纤维型反应器上得到使用。通过使反应物多次反复循环通过中空纤维超滤设备,直至达到所需的反应程度,其流动方式可达到塞流式。

超滤式反应器的缺点是反应器体积小,存在浓差极化作用(底物中的固体、脂类和胶质颗粒会使膜上的孔堵塞)。

3.23.9 电化学反应器

在电化学反应器中,使用氧化还原酶与供给电荷的电极相结合,问题是各种氧化还原组分与电极之间要有圆满的匹配(电子转移)(图 3.16)。电化学反应器可能作为燃料电池、分析用探针,并在合成化学上有用处。

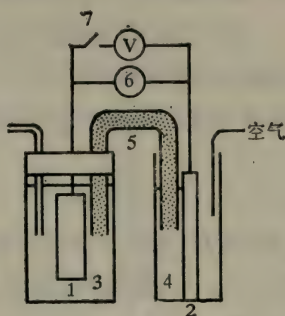


图 3.16 生物化学燃料电池的示意图。

(1) 固定化的完整细胞-铂黑电极, (2) 碳棒电极, (3) 阴极电解液, (4) 阳极电解液, (5) 盐桥(直径 1.5cm) (6) 记录仪, (7) 开关 (Karube 等, 1977, 1977 a)。

3.24 反应器的酶动力学

(见 A 部分 3.6、3.18、3.20、3.21 和 3.24)

这里所用的动力学表达式从只涉及单一产物而无底物或产物抑制的反应开始的,然后介绍反应物非理想流动和扩散

限制的影响。反应器工作时运转的温度、pH、底物浓度和转化率的最终选择取决于底物、劳务、管理等成本和所需的设备投资等经济评价。综合这些方面的总目的是试图减小反应器尺寸,降低达到一定生产能力所需的酶浓度。

米氏动力学处理方法可用来描述批式反应器的动力学,但最好使用对时间的积分公式。等温条件下,在批式反应器中,使用单一酶的无抑制作用的不可逆反应为:

$$XS - K_m'' \cdot \ln(1 - X) = \frac{KE\pi}{V} \quad (3.39)$$

这里 KE 为反应器内所有酶的最大活性,用每秒反应的摩尔数表示, V 是反应器的工作体积, π 为操作时间, X 为转化 $\frac{S - S_t}{S}$ 的程度,而 S 为起始底物浓度, S_t 为反应某段时间 t 后存留的底物浓度。

同样,塞流式反应器为:

$$xS - K_m'' \cdot \frac{\ln(1 - x)}{\ln} = \frac{kE}{q} = \frac{kE\pi}{V} \quad (3.40)$$

q 为每秒钟供给底物的容积速度, π 为底物溶液在反应器内平均存留时间(秒),若以 XS 对 $\ln(1 - x)$ 作图所得点的斜率等于酶的表现 K_m 的 2.303 倍。

因此,要考到底物转化为产物的程度,以及底物通过反应器的流速。另一个因素是在反应器内液体的混合程度,抑制剂的作用也要考虑到。注意,在反应器入口处的酶是处在与反应器达到的最后转化率无关的高浓度底物中,因此,实际上酶是在底物过量的零级反应动力学条件下工作的。而在反应器出口处,若达到高转化率,酶是处于低浓度底物条件下,因此酶是在一级反应动力学条件下工作。

对于混合充分连续流动反应器:

$$XS + K_m'' \cdot \frac{X}{(1-X)} = \frac{kE}{q} = \frac{kE\pi}{V} \quad (3.41)$$

当 S/K_m 低, 即可得到高转化程度时 (或使用低浓度底物), 反应速度为一级, 且达到特定转化程度所需的反应时间与 S/K_m 成正比例。在高 S/K_m 值时, 反应基本为零级, 在这种条件下, 达到一定转化程度所需的时间与 S/K_m 无关。在工业生产上实用的工艺通常要求把底物高度转化成产物, 而固定化酶一般是在一级动力学条件下工作的, 特别是商品化固定化酶制剂常使用高密度的酶。在这种条件下, 转化程度上较小的提高所需时间几乎完全取决于这段时间操作达到的 S/K_m 值, 因此这是一个非常重要的实验参数。

从描述塞流式和连续搅拌式反应器的公式来看, 当使用高浓度底物, 且 $S \gg K_m$ 时, 两种反应器特性实际上是一致的; 而在低浓度底物下, $S \ll K_m$ 时, 如果要达到高转化程度, 塞流式反应器的效率是 CSTR 效率的 20—30 倍, 另外的优点是具有多得多的酶分子密度。

在连续流动填充床式反应器 (或搅拌反应器) 中, 发现通过反应器的流速 (q) 与转化程度之间具有一种重要的关系 (图 3.17)。曲线的形状随产物抑制程度等因素而变化, 但只要流体动力学性质保持不变, 对任何大小的反应器来说, 曲线形状应是不变的。在使用高 S/K_m 达到低转化程度的情况下, 两种反应器的性能几乎一样。然而, 在低 S/K_m 值时 (当反应远大于零级时), 管式反应器特性在很大程度上比混合充分的反应器更优越。在这种情况下, 当塞流式反应器的流速比其他各种相仿的充分混合反应器的流速高得多的条件下, 可获高程度的转化。

每一种反应器中, 决定反应程度的是具有活性的酶量, 因此, 要在进行特定反应所需的酶量基础上对反应器进行比较。

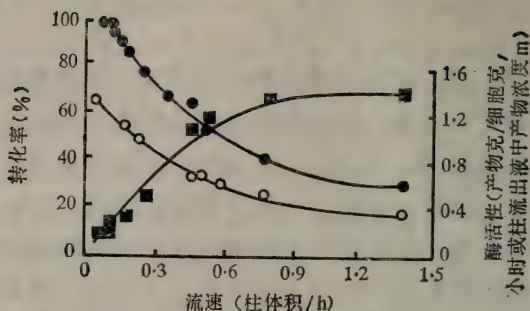


图 3.17 底物(蔗糖)存留时间对固定化在海藻酸凝胶中并用柱反应器中的大黄欧文氏菌细胞异麦芽蔗糖合成活性的影响, (■) 细胞活性, (●) 转化程度, (○) 柱流出液中的异麦芽蔗糖浓度(mol/L) (Cheetham 等, 1982)。

图 3.18 示出连续搅拌反应器中达到一定转化所需的酶量与填充柱式反应器所需酶量的比较。所需酶量对不同底物浓度

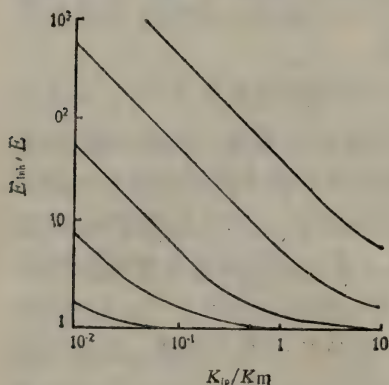


图 3.18 塞流式反应器内产物 (K_{ip}) 的非竞争抑制作用对在五种已知流速下达到 90% 转化所需的酶量的影响。 E_{inh} 和 E 分别为存在和不存在抑制作用时所需的酶量 (Lilly 和 Dunnill, 1972)。

作图, 在没有体积变化和抑制作用情况下, 零级和一级反应需要产生同样量的产物的塞流式反应器和 CSTR 大小的极限值是一致的。批式反应器需要的酶量会比连续反应器的高些, 因为批与批之间有“停机时间”的损失。如果 α 为连续反应器和批式反应器的工作时间比, 那么达到一定产率所需的酶量和反应器大小等于塞流式反应器 (P) 将是:

$$\frac{PX100}{\alpha} \quad (3.42)$$

3.24.1 酶反应器内的抑制作用

在以酶作为工业催化剂的大多数情况下,使用浓底物溶液,以达到接近于平衡态的高转化程度。由于这些条件特别是产生高浓度产物条件下与理论酶学所遇到的条件相差很大,比如一般不作为抑制剂考虑的一些产物,由于具有相当高的 K_i 值,也会有明显的抑制作用。因此几乎所有的反应器内部都会有一定类型和一定程度的抑制作用存在。底物抑制作用对酶反应器动力学的影响能够用描述底物抑制作用对酶催化反应影响的公式推导出来。

对批式和塞流式反应器:

$$XS - K_m \ln(1 - X) + \frac{S^2}{2K_s} (2X - X^2) = \frac{kE\pi}{V} \text{ 或 } \frac{kE}{q} \quad (3.43)$$

而对连续搅拌罐式反应器:

$$XS + K_m \frac{X}{(1 - X)} + \frac{S^2}{K_s} \cdot (X - X^2) = \frac{kE}{q} \quad (3.44)$$

因此在塞流式反应器中,一旦出现底物抑制作用,就是个比较严重的问题。而在搅拌式反应器内这种影响就不太严重,因为所有的酶实际上是在与产物流出液一致的底物浓度下工作的。使用连续几个反应器的组合并向每个反应器连续供给底物就可减小这种作用。在批式反应器中用分批方式供给底物的方法可以减少底物抑制作用;在塞流式反应器中沿其长度分几个点供给底物也可以减小底物抑制作用。但在工业中这些方法都没有得到应用。

当存在产物非竞争抑制作用时,批式和塞流式反应器的

特性可用下式描述:

$$\left(\frac{1-K_m}{K_{ip}}\right)XS - \left(\frac{1-S}{K_{ip}}\right)K_m \ln(1-X) = \frac{kE\pi}{V} \text{ 或 } \frac{kE}{q} \quad (3.45)$$

而连续搅拌罐式反应器为:

$$XS + K_m \cdot \frac{X}{1-X} + \frac{K_m}{K_{ip}} \cdot \frac{X^2S}{1-X} = \frac{kE}{q} \quad (3.46)$$

当 S/K_{ip} 值小时,产物抑制作用不是严重问题;但 S/K_{ip} 值大时,而且要得到高转化,则产物竞争性抑制作用就成为严重问题了。在塞流式和搅拌式反应器中均会发生这种作用,而且后者更严重,因反应器的内含物具有同样高的产物浓度。

当批式反应器受到非竞争抑制作用时,它的动力学行为可用下式描述:

$$XS \left(1 + \frac{S}{K_{ip}} - \frac{K_m}{K_{ip}}\right) - S^2 \frac{(2-X)X}{2K_{ip}} - \left(1 + \frac{S}{K_{ip}}\right)K_m \cdot \ln(1-X) = \frac{kE, \pi}{V} \text{ 或 } \frac{kE}{q} \quad (3.47)$$

连续搅拌反应器为:

$$XS + K_m \cdot \frac{X}{1-X} + \frac{x^2S^2}{K_{ip}} \cdot 1 + \frac{K_m}{S(1-X)} = \frac{kE}{q} \quad (3.48)$$

在非竞争性抑制剂而不是竞争性抑制剂存在,并且浓度相同、底物浓度相同和转化程度相同时,可得到较大程度的抑制作用。同时 CSTR 中的抑制作用比塞流式反应器中更严重些。

这些作用很容易用达到相同转化时,有抑制剂和无抑制剂存在所需酶量的比例来表示。图 3.18 表明塞流式反应器中达到 90% 转化时非竞争性产物抑制作用的影响。

上述描述生化反应器性能的公式初看好象深奥,但在实

践中已证实是很有用的。例如,只要提供比较简单的参数(如 K_m 和 K_i 值),就可以得出在最适条件下如何达到最佳性能的好设想。因此,即使在制定计划的早期,就可预计出可能达到的最好产率,估算出成本,也对酶反应器以外的前后处理所需的设备能力作出估计。

3.25 非理想态流动对生物化学 反应器性能的影响

当底物的不同成分以不同速度通过反应器时会产生非理想态流动,由于它们在反应器内存留时间不同,与酶接触的时间有差异,这样为发生程度不同的反应以及使所需产物发生进一步反应及副反应提供了机会。能引起非理想态流动的因素有:逆混合、沟流或在反应器内存在流动停滞区域。测定缓流示踪物的存留时间分布可估测出非理想态流动程度。例如把染料注入反应器入口,至它离开反应器(图 3.12),但有时必须允许多孔颗粒持留示踪的分子。

由于压降不断加大,载体填充不规则,以及底物上柱不均匀都会产生沟流。流体从最易通过的途径穿过柱,当底物与填充材料的摩擦比底物与壁间的摩擦大时,会沿一边向下流动,而当底物与壁摩擦使液流变慢时会沿柱中心下流。因此柱内的一些颗粒不与底物接触,因而与其他颗粒接触也各不相同。

涡流扩散作用也会引起流体的不均一分布。载体颗粒的大小和形状变化时就会产生这种效应,这是由于较大颗粒在填装时有靠近柱壁的趋势,因而整个柱截面上流速不同。

柱内的逆混合可用分散数进行定量,分散数的定义为:

$$\frac{D_c}{\mu l_c} \quad (3.49)$$

D_c 为分散系数, μ 为间充速度, l_c 为床深度。因此分散数大致随雷诺数增加而增加。这个值的倒数 $\mu l_c / D_c$ 为 Bodenstein 数。当以塞流式方式工作时, Bodenstein 数 (B_0) 为无限大, 完全混合时 B_0 为零。一般在固定化酶或固定化细胞柱内会明显偏离理想态流动, 这是因为载体颗粒间空隙作用如同混合小室, 因此得到小于 1.0 的 B_0 值(图 3.19)。然而, 从已发表的数据看, 偏离塞流方式是很少的。例如用固定化在聚酯囊中的链霉菌细胞 (Ghose 和 Chand, 1978) 和用固定化在多孔玻璃珠上的葡萄糖淀粉酶 (Marsh 和 Tsao, 1976) 所得的很接近塞流方式。计算结果支持了这种结论, 因此可以认为, 最合适的操作反应器达到了接近于塞流式的特性。在反应器操作中这是个重要因素, 因为一旦偏离塞流方式显著时, 要达到一定生产能力所需的反应器的尺寸就要激增 (Kobayashi 和 Moo-Young, 1971) (图 3.19)。

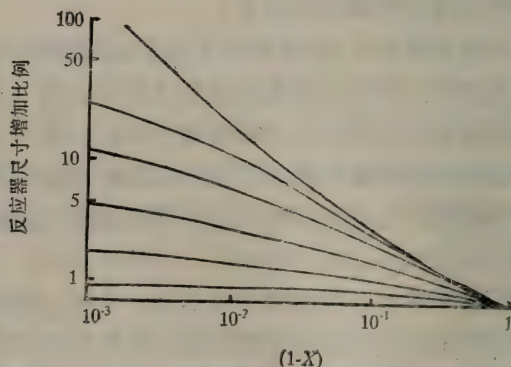


图 3.19 在底物转化程度 $(1-X)$ 范围内和 S/K_m 为 0.5 条件下, 补偿偏离理想塞流特性需要的反应器尺寸 (PTRS) 比例增加的图解。逆混合程度随 B_0 减小, B_0 是逆混合程度的测量, 在塞流条件下为无穷大, 而充分混合条件下为零 (Kobayashi 和 Moo-Young, 1971)。

分散数也可用 Pectet 数 ($N_{pe} = \mu d_o / D_c$) 表示,即:

$$\frac{D_c}{\mu l_c} = \frac{d_p}{l_c N_{pe}} \quad (3.50)$$

在柱反应器内混合是以横向或纵向进行,或两个方向同时进行。纵向混合存在很大问题。据认为载体颗粒之间的间隙起到混合小室的作用,从而引起纵向混合作用。纵向混合是否起重要作用取决于柱长和载体颗粒直径的比,当这个比例超过 100 时,这种混合就明显了。因而在大规模使用的柱内,甚至可以使用颗粒比较大的载体。在固定化酶系统内进行流体流动的试验研究是困难的。解决这个问题的有意义的途径之一就是使用流动测微荧光仪。它有助于说明固定化酶的固有活性与它的流体力学性质之间的相互作用 (Hofmann 和 Sernetz, 1983)。

在搅拌反应器中,只有增加搅拌速度或是降低底物粘度才可达到更有效的混合。达到较好混合的其他方法是降低生物催化剂颗粒浓度,或更有效的增加反应内的挡板阻力。在填充床式反应器中,填装不良、载体颗粒不完整、温度梯变均会引起非理想态流动,可以用达到需要的生产效率、反应器尺寸需增加的量来表示(图 3.19)。当 S/K_m 值高时,反应为零级反应,而且非理想态流动并不影响反应器的输出。然而,当 S/K_m 很小时,即达到高转化百分数,或使用低浓度底物,或酶对底物亲和力低时,逆混合变得很重要,并且为了达到一定的生产率所需要的反应器体积要增加,特别是在搅拌反应器中,这一点特别明显。为了达到塞流方式,就必须使用颗粒大小均一、光滑、球型、可均匀填装的载体颗粒,并且要使柱内不积累固体和气体。

逆混合作用以几种方式影响反应器产率,一些底物与离开反应器的产物流混合,因而就不能再用于形成产物(图

3.19)。逆混合作用也会降低底物浓度，从而降低反应速度。另一个作用是使反应发生处的产物浓度增加。非理想态流动还会使反应选择性显著降低，从而降低反应产率，因为有的反应物分子存留时间比平均存留时间长得多或短得多，这样分别为副产物的生成及所需产物进一步代谢或使底物不发生反应提供了更多机会。

3.26 使用固定化生物催化剂的生物化学 反应器中的物理学问题

使用酶反应器的主要机械问题是搅拌反应器内的磨损，以及填充柱反应器中的压缩和壅塞问题。这样的机械因素只在固定化酶用于大规模时才会遇到，而在小规模的分析 and 临床应用时不存在。另外可能遇到的问题，是在放热反应中反应器的过热导致酶失活，但这只是在大规模反应器上才是严重问题，因为热传递比化学扩散速度要快约两个数量级。

3.26.1 磨损

在连续搅拌罐反应器或流态化床反应器中，生物催化剂颗粒的磨损随切变速率、颗粒占反应器体积的比例增加而增加，而随悬浮液流的粘度和载体颗粒强度的增加而减小。例如，可参阅有关固定化在 AE-纤维素上的 β -半乳糖苷酶在搅拌反应器中的磨损的研究 (Regan 等, 1974)。解决这个问题的一個新办法是用电磁场搅拌固定化在磁性载体的酶，可避免颗粒与搅拌叶轮的碰撞作用 (Sada 等, 1980)，然而颗粒与颗粒之间的碰撞磨损仍然存在。

3.26.2 压缩

在填充床式反应器中，由于流体与颗粒间的摩擦作用和

颗粒材料导致的柱床部分堵塞,使整个柱压降增加而使生物催化剂颗粒发生压缩。压降可用 Carmen-Kozeny 和其他类似的方程描述 (Coulson 和 Richardson, 1970), 其中柱高和通过柱的液流流速是主要的决定性因素。当使用小颗粒或形状不规则颗粒,并且填充在长期使用的高大的柱中时,填充床的压缩极有可能。在雷诺数很小的条件下,非压缩性柱中压降与流速成线性关系,对流动的阻力是恒定的。易变形或可压缩柱的压降随流速的增加而成指数增加,通常开始时压缩增加很快,压缩率随时间延长而成指数降低,这就是材料科学上人所共知的“蠕变”作用。蠕变是在材料长期经受相当小压力的情况下发生的缓慢而持续的材料变形。如极高粘度流体(如玻璃)在自身重量作用下的变形。除非压力很高,或突然施加压力,通常载体颗粒不会破碎,但会发生粘弹性变形,从而随填充床高度降低使柱内颗粒间的间隙减小,结果使通过柱的流速下降,柱压降增大。柱压降的增加又引起进一步压缩,循环往复,最后使柱完全堵塞(图 3.20)。使用较大的、不压缩的、光滑的、珠型的填充材料,均匀填装,或使用分级

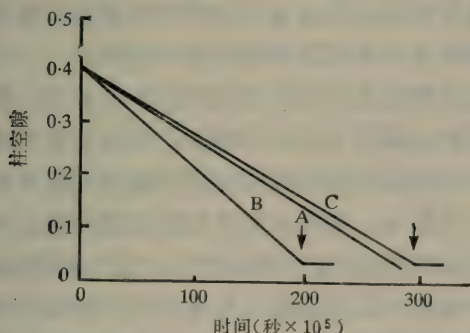


图 3.20 海藻酸钙凝胶颗粒在柱内长期使用后的压缩率的测定。柱以下行方式运行,使用 (A) 蒸馏水、(B) 1.6 mol/L 的蔗糖为溶质, (C) 是与 (B) 相似的柱,但蔗糖液用泵,以上行方式打入柱内。↓代表发生柱堵塞的点 (Chectham, 1979)。

柱、间歇流态化柱,或降低柱高与直径比,都可减小压缩作用,但在实际填充柱时都有困难。由于不同固定化制剂的制备和使用条件差别很大,它们的压力模式很难进行比较。

3.26.3 壅塞

壅塞会引起固定化生物催化剂活性损失,这是由于固体或胶体物质(原是悬浮于底物中,或载体周围或孔内)沉积妨碍了底物与酶接触。在搅拌反应器中,出口和进口过滤器的壅塞是主要问题。然而在填充床式反应器中发现壅塞在颗粒之间的空间出现(和颗粒上的孔),壅塞程度因壅塞物质的量、大小分布和物理化学性质不同而变化。另外,生物催化剂是处于载体表面还是内部也是重要因素。当使用浓的粘性底物时,壅塞作用也会加重,甚至使用澄清透明的底物也可能发生壅塞,这是由于反应条件(如 pH)的变化会产生固体物沉淀。即使是不溶性固体物的浓度很低,也会发生严重堵塞,特别是固体物在柱的入口处沉积形成紧密的薄层或者底物流量很大时,壅塞更为严重。通过加热或化学物质预处理及用过滤或离心使底物澄清可减小壅塞,但费用大,操作不方便,并且不能用在某些以天然形式出售的物质如牛奶。

壅塞是限制固定化生物催化剂在许多食品、饮料和制药工业上应用的主要因素,因为这些工业需使用澄清的底物流,因此在生物催化剂与底物作用之前需用分离方法将底物溶液中的固体除去。如果未加工底物是廉价的,例如农产品来源的底物,那么这种化学原料的加工能力将是有利的。

类脂、胶体物质、蛋白质和悬浮的固体颗粒是最常见的壅塞物,如酵母菌体匀浆及全乳清会很快堵塞填充床柱。壅塞可分为两种主要类型,外壅塞将生物催化剂颗粒之间的空隙填塞,最初发生沟流,以后使柱完全堵塞,即使在高压下液

流也不能通过柱。单个生物催化剂颗粒的孔内壅塞像超滤膜或多孔小粒上的一样,形成一薄层,虽说流体还能自由通过填充柱,只有很少底物能透到载体颗粒内部,并与固定化酶与固定化细胞接触。若将壅塞物释放出来,比如将固定化酶磨碎,活性就会增加,即可检出这类壅塞。内壅塞和外壅塞常常在同一系统内同时发生,当然也可单独发生。然而,采用间隔式填充、液化化或反冲洗柱床,是可以避免柱的壅塞。

在使用壅塞底物流时存在的问题是复合的,因为这些底物往往很粘稠,也许是壅塞固形物的物理性质造成的。工业生产上往往希望使用浓的底物溶液,以减小加工的流体体积。而使用这样的粘稠流体,使底物流的预过滤或离心都更困难。

以往沿用离心或过滤澄清底物的办法,费用高,特别是加工大量低值产品时更显昂贵。当壅塞固形物就是产物的主要成分时,就更不能使用上述方法。例如不能在牛奶加工前除去胶体物质,因为不可能把牛奶重新配制成它原来的状态。可使用搅拌反应器或液化化床反应器,在壅塞物颗粒明显小于催化剂颗粒的情况下消除外壅塞。然而,这种反应器需较大的输入功率,许多固定化催化剂的载体颗粒在搅拌反应器内易磨损,在动力学上也可能存在缺点。实际上填充床反应器的外壅塞往往是暂时的,用重新装柱、反冲洗或间隙通上行气流等均能克服;但这些措施对连续操作来说是不方便的。另外,使底物高流速循环有助于避免壅塞。最近有人提出在搅拌反应器或流态化床反应器中使用无孔磁性固定化酶,在反应物分子小的情况下,可作为克服悬浮固体壅塞的一种方法(Halling 和 Dunnill, 1980)。例如固定化在磁性载体上的胰凝乳蛋白酶水解酪素(Monrone 等, 1981)。更新的方法是用可溶性酶进行反应,然后用生物亲和方法将酶完全和专一

回收。使用的与酶相结合的配基是结合到磁性载体上 (Hal-ling 和 Dunnill, 1979)。

底物溶液中的不溶性颗粒带来的问题是明显的,尤其在固体颗粒就是底物时尤为严重。比如酪素的水解和为释放胞液中的内含物进行的微生物细胞壁的酶解。使用可溶酶或结合在可溶性聚合物(如葡聚糖)上的可溶性固定化酶,是解决上述难题的可能办法。

3.26.4 微生物污染

在制造食品和医药产品时,通常需保持无菌,较为一般的要求是保持一定的卫生条件,因此必须严格检测和避免微生物污染。若底物就是微生物生长所需的营养物,污染就更加容易;在反应器中存留的时间长,反应器内有易滋生菌落的滞留区域或粗糙表面,也会引起污染。防止污染是重要的,这不仅因为不希望介质中有细胞存在,还因为细胞会堵塞柱,并产生酶和代谢物,进而使产物降解或产生令人厌恶的副产物,或使固定化酶活性载体降解。当产物如抗生素、酒精、有机酸能抑制微生物生长时,污染会减小。向底物加入杀菌剂、抑菌剂、有机溶剂或其他物质,或隔一定时间用它们处理反应器,也取得一定的成功。一般抗菌剂如山梨酸,由于缺乏其作用方式方面的知识,使之受到一定限制。例如,Baret (1980)用取代的二乙烯三胺对水解乳清中的乳糖的固定化黑曲乳糖酶柱进行消毒,每天处理可大大降低柱流出液中的微生物数量,并使酶活性保持较高的水平。

已在实验室使用的一种新方法是将酶作为抗菌剂,比如固定化过氧化物酶 (Herry 等, 1974), 固定化溶菌酶可用于固定化 β -半乳糖苷酶柱中,防止枯草芽孢杆菌的污染 (Mattiasson, 1973) (图 3.21), 也可使用固定化在骨胶原中

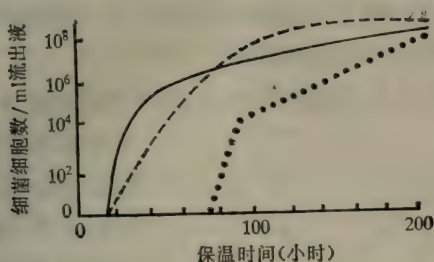


图 3.21 含有 β -半乳糖苷酶柱的流出液中细菌细胞数与时间的关系 (——), 下部为 β -半乳糖苷酶, 上部为固定化溶菌酶(---), 共固定化的溶菌酶和 β -半乳糖苷酶(·····), 是结合在 Sepharose 4B 上。使用的底物溶液是每毫升含 10^6 细胞(枯草杆菌)的 pH 7.0 0.1 mol/L 磷酸钾的 10 mmol/L 乳糖, 试验在室温下进行(Mattiasson, 1977)。

的半月无色杆菌 (*Achromobacter lunata*) 中溶菌的酶 (Karube 等, 1977)。

3.27 固定化生物催化剂的稳定性

3.27.1 引言

固定化酶的稳定性取决于酶的性质、酶的固定化条件及使用条件, 即反应器类型和反应条件。影响酶的稳定性的因素目前尚不完全了解, 各种酶的稳定性差异很大, 如从耐热微生物获得的酶, 不仅耐热, 对其他变性剂都很稳定。由抑制剂引起的酶活性降低, 应与酶变性(如热变性)引起的活性降低区别开来。事实上, 各种不同因素是一起发生作用的, 每种因素都相当重要。比如氧化作用和蛋白酶的降解都与使用的体系有关。酶的固定化会影响其工作稳定性, 试验表明, 有的酶稳定性升高, 但也有的降低。例如蛋白酶固定化后更抗自我消化作用。共价结合到载体上的酶, 共价修饰作用使酶的三

维结构稳定化。固定化使酶稳定,仅仅由于酶被浓缩,保持在局部高浓度蛋白质中更加稳定。

酶变性可认为是酶抑制作用的一种特殊情况,扩散效应

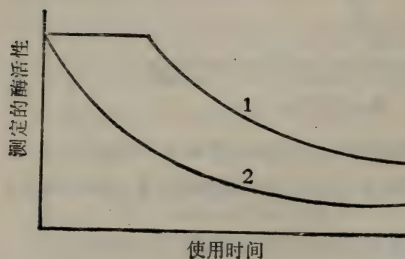


图 3.22 固定化酶 1 和游离(可溶)酶 2 的工作稳定性的时间曲线图,注意,固定化酶一般比可溶酶稳定,在一段时间内固定化酶似乎没有活性损失。引自《生物技术学原理》,A. 怀斯曼主编, Surrey 大学出版社,1983。

将增加固定化细胞的表观活性,其机理类似于固定化酶中描述的(Ollis, 1972)。一般认为变性作用有两个过程:分子的可逆解螺旋,接着是分子的不可逆化学修饰或聚集引起溶解度和催化活性降低。用荧光活性位点滴定法可直接估计未修饰的酶活性位点所占比例

因此可估计催化活性。

然而,有些关于固定化作用提高操作稳定性的报告存在人为因素,由于扩散的限制,固定化酶在开始时只表现出部分活性,当这部分活性因变性失活后,其余作为贮存形式的活性才起作用(图 3.22)。这样,只有在使用足够长时间,“缓冲”的酶活性失去后,才能观察到活性随时间减小。在无扩散限制情况下,活性衰变与时间成指数关系;相反,在有扩散限制时,活性衰变与时间成线性关系(图 3.23, 3.24)。这种现象最好的例子是成珠型的细胞上的葡萄糖异构酶,当扩散限制其活性时,活性损失与时间呈直线关系;进行到后期,又可观察到余下的少量活性与时间成指数衰变(Regan, 1977)。Kobayashi 等(1980)曾对此现象作过详细讨论,见图 3.23。在多酶体系中,持续的活性取决于细胞膜的完整性,即使是复合

酶,如用于葡萄糖生产酒精,酶活性仍呈指数衰变,就像单一固定化酶一样。大概由于一种酶通常比另外的更不稳定,以至限制和决定了整个系统的稳定性。

反应器的微生物污染或机械堵塞常会突然发生,导致酶活性急剧下降,突然失活,因此要实地测定固定化酶在使用期内的稳定性,而不能从短期使用中得到的数据加以外延。同样,在实验中获得稳定性不一定能在较大规模的应用上重复出来。

生物催化剂,如游离的和固定化的细胞和酶,在使用方法上通常要符合现代化工原理和实践,同时要考虑到它与化学催化剂相比具有的特殊催化性质,如立体专一性、反应机理和相对不稳定性,这样在工业应用中才有可能获得成功。固定化酶的初始活性和稳定性直接影响它在工业上的应用。如果载体材料便宜、易得,使用一段时间可丢弃或者载体容易再生,也可使用稳定性稍差但活性高的固定化制剂。如果酶和载体很贵,并且载体不能再生,那么固定化酶的高稳定性就是重要的。

通过固定化使酶稳定的好实例是有的,特别是用固定化细胞和(或)凝胶载体时,酶的稳定性增加更显著。例如,把极不稳定的氢化酶保存在真氧产碱菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 细胞内 (Klibanov 和 Puglisi, 1980); 通过固定化在海藻酸钙凝胶中,而不采用提取的酶固定化,使大黄欧文氏菌细胞的

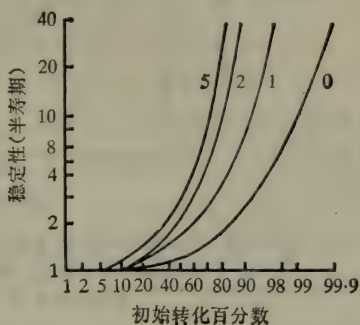


图 3.23 内扩散限制对固定化酶稳定性的影响,按底物转化一半所需时间确定 (Kobayashi 等, 1980)。邻近直线的数字是 Thiele 模数值,其中标记 0 的线为无内扩散限制下的值。

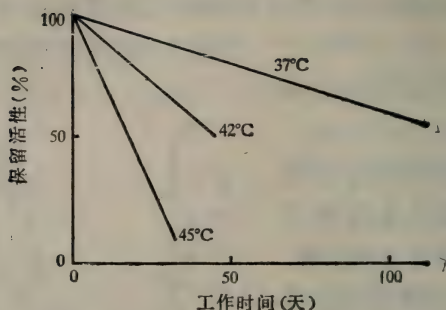


图 3.24 在三种不同温度下固定化大肠杆菌细胞的天冬氨酸转氨酶的工作稳定性。增高温度，酶活性较高，但是稳定性较差 (Chibata 等, 1976a)。

麦芽蔗糖合成酶的稳定性提高 (Cheetham 等, 1982); 用脱硝酸盐假单孢菌 (*Pseudomonas denitrificans*) 使饮水脱氮 (Nilsson 等, 1980), 以及用海藻酸盐固定化的植物细胞生产生物碱 (Brodellius 等, 1979)。最后一例很有趣, 看来固定化细胞的代谢已从生长转向形成次生代谢产物。金属离子也可作稳定剂, 一个重要例子就是 Ca^{2+} 对 α -淀粉酶的稳定作用。

若保持细胞的存活能力, 固定化细胞制剂的活性常能增加, 并且比原来的活性更高。这需要定期供给营养物, 以使具有酶活性的新细胞生长 (Ohlson 等, 1979)。酶通过多点偶联在载体上, 也可稳定化。例如核糖核酸酶的热稳定性可提高约 10°C 。用这种方法使马来酸脱氢酶具有“嗜盐性”, 甚至在 4 mol/L NaCl 溶液中仍保持酶活性 (Koch-Schmidt 和 Mosbach, 1977, Koch-Schmidt 等, 1979)。

有几种因素能影响固定化酶和细胞的稳定性。包括过热、重金属和能使酶的三级结构混乱的变性剂。这些因素有直接的, 也有间接的。直接作用包括对酶的化学修饰, 比如固

定化蛋白酶可用酰化作用加以稳定(Maneepum 和 Klibanov, 1982)。对保持酶正确构象很重要的氨基酸的自发氧化也是重要的,特别是那些在活性位点上具有催化活性的氨基酸。因此,许多固定化材料提供的嫌气环境可能是有利的。另一种作用是蛋白酶的污染,它们可能是由污染的微生物分泌的,在固定化细胞中也可能是内源的。采取的办法是,在较高温度下操作要尽可能减少微生物污染;在底物中加入杀菌剂;在稍低的温度下收集和保存细胞可防止微生物污染;选用蛋白酶活性低的微生物菌种。另一种方法是使用蛋白酶产量低的培养基培养细胞,例如,培养基中不用蛋白质,或在蛋白酶产量最低的生长期收集细胞。将酶制剂中的蛋白酶进行变性处理也是有用的,葡萄糖异构酶就采用这种方法(Adler 等,1979)。其他方面还包括保持低水活度环境,如保持高反应物浓度;保持固定化细胞的完整性,也许因为细胞的天然环境提高了酶的稳定性。此外,尚有些详细记载的例子,如将酶多重键结合到载体上,酶结构稳定化程度随酶-载体间的键数增加。

间接作用包括固定化制剂的壅塞,使酶活性受损失,妨碍酶与底物分子接触,比如颗粒物质会堵塞固定化酶载体的孔。有些反应物对酶有稳定作用,底物对酶的稳定作用是众所周知的,按理说,酶-底物复合物要比单独的酶稳定;同样,产物也有类似的稳定化作用,特别是产物对微生物污染有抑制作用时更加明显。固定化对脆弱的细胞有机械稳定作用,例如,已成功地把表面独立杂交瘤和淋巴样细胞,以固定化形式用于连续形成单克隆免疫球蛋白和淋巴细胞激活素。固定化后细胞以高密度被利用,并有机机械稳定作用,因此避免了分离细胞和其产物的一些必需方法(Nilsson 等,1983)。

在试验中要遇到的问题是进行稳定性测定所需的原料和时间,特别是固定化酶或固定化细胞的工作稳定性良好和测

定需大规模进行时更为突出。有时要借助“速成稳定性试验”使反应在高于实际应用的温度下进行,以便使固定化制剂衰变速度更快。另一困难在于任何特定酶的最大可能的稳定性或“极限”稳定性在试验中是不知道的,因此试验者不清楚达到最大可能寿命是1%还是99%。

最后,在某些情况下酶的异常稳定性在工业上是个问题。比如在食品工业上大规模应用的细菌 α -淀粉酶,即使在沸水中失活也相当缓慢,有活性的酶可能污染产物,带来不良后果。同样,微生物粗凝乳酶也有类似问题,其实通过化学修饰可使热稳定性降低。

3.27.2 利用固定化酶或固定化细胞的生化反应器的稳定性

许多因素会影响实际工作中固定化生物催化剂的稳定性,包括底物中某些物质对酶的不可逆抑制作用。引起变性作用的最主要因素是温度、pH、离子强度和剪切力。此外,还有微生物或酶的作用,尤其是堵塞柱的微生物产生的蛋白酶。其他因素诸如细胞或酶从载体上脱落下来、载体溶解和破碎以及底物与酶接触不良。在有蛋白酶存在的情况下还会发生自水解。

当反应是由扩散作用控制时,活性衰变比较缓慢。不管扩散限制是由较高的酶浓度或使用较大的固定化制剂颗粒引起的,还是由于底物在颗粒内扩散较慢或是使用较低浓度底物造成的,的确都使活性衰变缓慢。有时活性衰变与时间成线性关系,直到活性降低到反应受扩散控制点为止。如果酶在使用过程中从反应器内流失,活性衰变曲线为凹型;而酶发生累积性抑制作用或变性作用时,活性衰变曲线为凸型。对于一级反应类型的衰变

$$-dE_0/dt = \lambda E_0$$

则

$$\ln \frac{E_0}{E_t} = \lambda t \quad (3.51)$$

式中 E_0 为反应器内的初始酶活性, E_t 为工作到 t 时后剩余的酶活性, λ 为衰变常数。实际应用中反应器的稳定性一般用半衰期表示, 即初始活性损失一半所用的时间 ($t/2$), 不过援用一级衰变常数更恰当。

$$\text{半衰期 } (t/2) = \ln 2 / \lambda, \text{ 即 } (0.693 / \lambda) \quad (3.52)$$

或

$$\text{半衰期} = \frac{t \ln 2}{\ln (E_0 / E_t)} \quad (3.53)$$

术语半衰期必须与批式反应中表示完成一半反应所需时间的半衰期区别开来。

运转一定时间 (t) 后保留的活性可用下式表示:

$$\text{在 } t \text{ 时的活性} = \text{初始活性} \cdot \exp(-t/T_c) \quad (3.54)$$

式中 T_c 为时间常数, 即固定化活性衰变到初始活性的 36.8% 所需的时间。在实际使用中, 反应器工作一定时间后再计算一下; 如果更换或再生催化剂更有效, 就不再继续使用原酶制剂。

找出催化多步合成反应的固定化细胞活性稳定化的通用方法, 也是这个领域研究要解决的主要问题之一。除了操作稳定性外, 还必须了解生物催化剂的贮存稳定性, 这样可以让用户按自身的技能来运输和贮存, 特别是在工作期间的保存。如淀粉酶常用淀粉水解物、糖类或其衍生物作为稳定剂, 而蛋白酶可用蛋白质产生的肽来稳定。另外一些方法也能很好地贮存, 例如将甘油脱氢酶、腺苷酶和 3', 5'-环化 AMP 磷酸二酯酶吸附在葡聚糖凝胶 G-50 上, 可在 0°C 左右干燥保存, 几年仍有活性 (Schneider 和 Friedman, 1981)。

3.27.3 生物催化剂活性的再生

有些酶能经受可逆变性，因此也能再生。再生仅局限于已失活的酶解吸，然后再将新鲜的未曾用过的酶固定化（图 3.25）。这种方法只适应于用在吸附法固定化的酶，并且酶的生产、载体再生和使用固定化酶的工厂都在一起时才有可能进行再生，因为新的固定化酶和用过的固定化酶的运输费用是很高的。理想的载体要便宜、来源广，以便一次使用后可以废弃，而用新的固定化酶或细胞代替。通过再诱导酶或供给生长培养基以便细胞以原位生长的方法使固定化生长的细胞活性再生。然而，有时不能使用原来用于细胞生长的培养基，这种情况下用复原型的培养基更加有效（图 3.26）。细胞生长会引起细胞从载体上漏出并增加颗粒内的扩散限制，因为新生长的细胞可能堵塞载体的微孔，或是不均匀分布在整个载体内。原处生长的细胞还会使颗粒内的压力增加，使颗粒破裂。

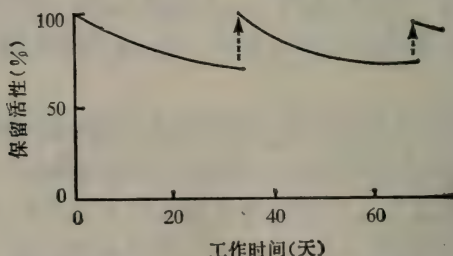


图 3.25 用在填充床柱内并固定化在 DEAE-葡聚糖凝胶上的氨基酰化酶的稳定性和再生。将用过的酶解吸，然后将新鲜酶吸附在原来的离子交换树脂上进行再生（↑表示）（Chibata 等，1976）。

3.27.4 生物催化剂反应器的恒定生产能力

在使用填充床式反应器的情况下，要维持恒定的生产能

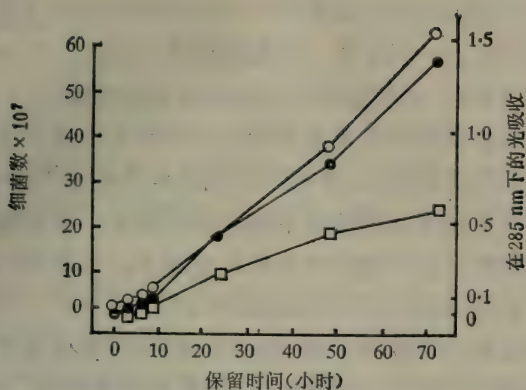


图 3.26 用营养物活化各阶段的简单节杆菌的活性 (在 285 nm 下光吸收值) 与细胞数之间的关系。□ 表示固定化细胞的 Δ' -脱氢酶活性, ● 表示海藻酸盐载体溶解后的游离细胞的 Δ' -脱氢酶活性, ○ 表示活细胞数(细胞重量) (Ohlson 等, 1979)。

力(在生产中通过添加新鲜生物催化剂), 在操作上总是不方便的, 甚至是不可能做到的。通过控制反应器的流速却是一种有用的方法。连续或间歇降低流速可保持转化率恒定。但在生产周期中, 单位时间产物的含量会降低。因此就必须根据一定时间内形成产物的量决定流速, 而不能按活性或一定时间内达到的百分转化率。扩散限制作用会引起一个延滞期, 即在反应器开始工作后的一段时间内表现出活性不降低, 进入这一时期有助于达到恒定的转化。用增加温度也可以维持产量恒定。在反应过程中, 随时间而出现的酶活性损失将为较高温度下酶活性增加所补偿; 因此, 随时间变化的工作温度的变化率应当提供。Park 等 (1981) 描述了用在葡萄糖异构酶的这种方法。比较复杂的温度变化可用微处理机系统容易而精确地加以控制。使用较高温度时, 生物催化剂的稳定性肯定差得多。利用固定化产氨短杆菌细胞的富马酸酶, 在工业上生产苹果酸, 就是通过控制操作温度的一个实例。

将若干使用不同时间和处于不同阶段的柱反应器串联,并与上述方法之一相结合,是普遍采用的方法。Verhófi 和 Schlager (1981) 发现这种方法能较好地利用酶,但与用连续降低流速以控制转化的反应器相比,体积大。由于不断用新柱代替活性已耗尽的柱,尽管每个柱的生产能力不断衰减,但总的固定化生物催化剂的量不随时间而变化。反应器的数量越多,积聚的反应产物的浓度变化就越小。当使用许多较小的柱反应器时,柱的压缩问题也就小。

使用适当的反应器,并维持恒定转化时,输出水平可以在任何范围变化,通常允许流速在 $\pm 5\%$ 范围内波动。由公式 3.56 可计算出维持一定生产速率所需的最少反应器数量。采用错开启动,掌握好换柱的时间,能使在预定的输出或转化水平时具有最小波动,反应器也能平稳工作 (Venkatasubramanian, 1980)。

$$M_i/M_x = \exp(n \ln 2 / N_r)$$

式中 N_r = 反应器的数目, n = 催化剂的半衰期, M_i/M_x = 最小和最大生产率之比。大多数工厂最少使用六个柱的反应器组,并用微处理机反馈控制。增加反应器数量可以具有更好的操作适用范围,并能减小流速的波动。然而,反应器、管道、阀门和其他设备所需的费用是较高的。此外,由于要经常更换催化剂,生产成本也会增加。

反应器可以串联,也可以并联。串联操作要控制的物流较小,催化剂能较充分利用,但是操作中的压降和压缩问题比较大。并联有最好的操作适应性,每个反应器基本上可以单独工作,每个单元能很方便地加入或离开运转系统。实际生产中的状态主要取决于各种相互关联的运转参数的含量,最重要的有固定化载体成本、底物通过反应器的流速、固定化细胞或固定化酶的活性和稳定性等(图 3.26)。

3.28 放 大

在发展一种工艺时要从以下几方面考虑它在经济上的可能性,例如工业化后可能的资金流动,工艺和产品的可能的经济效益,这些又与原料成本、转化效率、生产规模等因素有关。

实际上只有在产品产量超过生产能力的三分之二时,产品的单位成本才有可能降低。这种关系表明,为了获得经济效益,生产规模要尽可能大。大规模生产有两点好处,大生产需要较大的金融投资,对于那些尚未进入这个领域的竞争者将有很强的抑制作用;其次,大规模生产即使进行有限的改进,也会获得很大的经济效益。

扩大是使工艺发明、研制、设计以及工程设计、工厂规划、工厂人员组成等向商业化发展的非常重要的因素。

固定化步骤扩大,就是要确定酶与载体和各种试剂混合比率和程度,以及每一步所需的时间,以便转用到较大规模生产。如果固定化过程是吸热或放热的,那么需对所用的容器进行加热或冷却。一般说来,要发展大规模酶和细胞的固定化方法,劳务要尽可能少,载体应便宜、丰富易得,并且在相同的良好生产条件下可进行重复。

扩大工艺时,几何外形和动力学性质应尽可能不变,对已有的可采用的设备不应忽视,在较小规模上不很重要的影响因素,在较大规模上可能会变得十分重要。比如填充床反应器中的沟流和压缩问题,反应器和管道内“死角”的污染微生物的生长,以及为得到反应物浓度、温度、pH 等准确而有代表性的数据资料而使用的检测设备的位置等。扩大生产最明显的变化是工厂规模的设备都是不锈钢的,而实验室的大部

分设备是玻璃的;原来在实验室很容易的操作程序,到大规模应用时可能变得很困难,甚至不可能。比如高速混合的难度随之增大;用于控制 pH 的缓冲剂由于价格高或污染产品而较少使用。然而,其他有些方法,比如在篮式离心机中批式使用离子交换树脂,较大规模却更容易些。还应注意到,使用很大的反应器在经济上是有好处的,但须考虑到由于事故或操作人员的失误可能造成的损失。

酶反应器和细胞反应器与发酵不同,不必在完全无菌的条件下操作,主要因为不必特意提供微生物生长的良好条件和丰富的营养物。但是要在具备必要的卫生条件下操作,特别在产品是人和动物的食物、饮料和药品时,即使是痕量的氮源或其他营养物,都会出现微生物生长。因此,应把重点放在反应物快速通过,使用较高的操作温度,在底物中加入杀菌剂,以及设计和构建有效的反应器(避免微生物可能存留和繁殖的死角,减少微生物污染途径,如采样口数,避免卫生区与非卫生区相通)。高浓度底物可以提高渗透压、降低水活度、抑制微生物生长。若是生产抗生素、有机溶剂或酒精,达到卫生要求是不困难的。

此外,在每次使用后,反应器要进行适当消毒,可用酸性水或含有过氧化氢、季胺盐的水反冲。一般地说,工艺越简单越好,以使工艺步骤和昂贵复杂的设备减到最少。

好的操作工艺对生产工人和产品消费者的保护是最根本的,重要的因素还应当包括工艺外围设备、保护设备、常规清洁设备和常规监测化学和微生物污染的设备。微处理机更适于自动控制起动、关闭和清洗设备,也减少了工作人员进入不安全区的机会。有关这些论题的详细讨论可参见下列几本书:《Patty 氏工业卫生和毒物学》(Wiley Interscience),《CRC 实验室安全手册》,《食品工厂的卫生设计和卫生操作》

3.29 讨 论

本章目的在于概述与酶以及类似生物催化剂的工业应用有关的酶工程原理。本领域仍处在初期阶段,还有许多重要问题需要解决。这些问题包括克服渗透障碍;向以氧作为底物的固定化酶或细胞供氧;使用不溶性和水不混溶的底物,如甾体化合物和碳氢化合物;发现具有异常酶活性的新酶;使用不大容易利用的酶,如膜结合酶类;利用含有机溶剂或含堵塞固定化生物催化剂的不溶性固体颗粒的底物能力;辅因子原位再生能力,以使耗能合成反应得以进行,同时也可解决辅因子利用受限而引起的高成本问题;使用“逆反应”的酶;共固定化细胞和共固定化酶和细胞器等的应用,以便进行复杂的多步反应。还需要发展稳定酶和静休细胞的有效方法,控制最适 pH、温度、稳定性的反应平衡点,酶底物特异性等的通用方法。特别要搞清完整细胞内酶的生物合成、自消解和调控,以便更有效地提取酶并有效地作为催化剂使用。对固定化生物催化剂的特性需作充分研究,这样才能确定酶在工业生产中的各种催化潜力,不仅可生产高价的小批量产品,也可以生产低价的基础产品。比如从再生资源生产燃料和溶剂,而这些产品是用化学催化剂以非再生的石油为原料生产的。

凡涉及酶稳定性、固定化扩大、水不溶载体的利用等有关基本原理和概念的论题,都是很活跃的研究内容。在这个领域所进行的研究工作大多是凭经验的,目标集中在满足实验室规模的制备,而不是对基本原理作进一步了解。

如果上述一些问题能得到满意的解决,并在科学家、工艺学家及懂得工艺过程和产品生产和经销人员之间建立起真正

的协作关系,酶工艺才不会陷于单纯的研究产品的技术学,并且在近期进入这一领域的研究成果就可以采用并可证明是正确的。

证 据 说 明

最近发表了几种有前途的控制酶底物专一性和其他性质的技术,包括酶复原技术,通过酶活性位点直接诱变对活性位点再设计,非特异性抗体的选择使用,以及把酶偶联到化学催化剂上。

Sarawathi 和 Keyes (1984) 使蛋白质在有竞争性抑制剂存在下进行复原而具有满意的酶活性,然后透析除去抑制剂并使蛋白质交联,以保持新形成的构象,产生新的酶活性。比如用吡啶丙酸处理核酸酶可形成“酸性酯酶”。

Winter 等 (1982) 和 Willinson 等 (1984) 证明单点诱变会使嗜热芽孢杆菌酪氨酰 tRNA 合成酶的一个氨基酸发生选择性变化,酶对 ATP 的 K_m 降低 100 倍。这种方法需了解酶的三维结构和产生生物的 rDNA 方法学的有关知识,并对每种氨基酸的催化功能有正确的概念。

Soloman 等 (1984) 发现,能提高羧肽酶的单克隆抗体可分离成能选择性抑制其肽酶活性或酯酶活性的部分。

第 4 章 酶的固定化原理

J. F. 肯尼迪

C. A. 怀特

4.1 固定化酶的分类

固定化酶分类的方法有几种，在某种程度上是由描述固定化酶的定义所决定的。固定化酶这一术语包括以下内容。

(a) 经适当技术改造成为水不溶形式的酶；

(b) 在配备半透性超滤膜的反应器内使用的可溶酶。半透性超滤膜可使高分子量底物水解产生的反应产物通过，但酶分子被截留在反应器内；

(c) 束缚在另一种大分子上，自由移动受限制的酶，但所形成的整个复合分子仍保持水溶性。

因此，分类必须把与固定化作用有关的性质和载体性质结合起来作为分类依据。图 4.1 描述的是本书所采用的分类

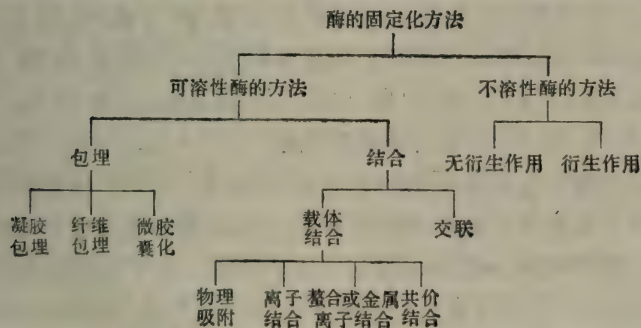


图 4.1 酶固定化方法的分类。

系统和本章要讨论的各种固定化方法（将在B部分作更详细讨论）。

4.2 酶固定化技术

近几年采用的酶固定化方法的种类有显著增加，下面将介绍上述分类系统内的一般方法。

4.2.1 包埋

包埋固定化法是把酶定位于聚合物材料或膜的格子结构中，这样可防止酶蛋白释放，而允许底物分子穿透。此法制备的固定化酶限于底物和产物分子比较小的有关反应。由于酶没有结合在凝胶材料或膜上，因此比其他方法通用，可用于包埋各种酶、微生物细胞和具有不同大小、不同性质的细胞器。此法不必多考虑酶性质等问题，而且生物活性破坏也少。包埋又可再分为凝胶包埋、纤维包埋和微胶囊化。

4.2.1.1 凝胶包埋

凝胶包埋法是将酶埋在交联的水不溶聚合物凝胶的空隙中。交联聚丙烯酰胺包埋法是首先被采用的包埋技术。Bernfeld 和 Wan (1963) 用此法固定化了胰蛋白酶 (EC 3.4.21.1)、木瓜蛋白酶 (EC 3.4.22.2)、 β -淀粉酶 (EC 3.2.1.2) 和 D-果糖二磷酸醛缩酶 (EC 4.1.2.13)。形成凝胶的一般方法是在可溶酶和交联剂的（如 N, N-甲撑双丙烯酰胺）水溶液中使丙烯酰胺聚合。然后用机械破碎的方法将所形成的凝胶块破碎成所需大小的颗粒。由于凝胶的孔径大小相差很大，不可避免地会造成包埋的酶外漏，洗涤时间稍长就会漏出 (Bernfeld 和 Wan, 1963)。而且聚合反应过程

表 4.1 凝胶包埋酶实例

材 料	酶	参 考 文 献
聚丙烯酰胺	乙酰胆碱酯酶 (EC 3.1.1.7)	Ngo 和 Laidler (1978)
	胰凝乳蛋白酶 (EC 3.4.21.1)	Martinek 等 (1977 和 1980), Kuan 等 (1980), Halwachs 等 (1978)
	天冬酰胺酶 (EC 3.5.1.1)	Mori 等 (1976)
	D-葡萄糖脱氢酶 (EC 1.1.1.47)	Chen 等 (1979)
	醇脱氢酶 (EC 1.1.1.1)	Chen 等 (1979)
	β -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23)	Danielson 等 (1979)
	苯酚-2-单加氧酶 (EC 1.14.13.7)	Kjellén 和 Neujahr (1979 和 1980)
	脲酶 (EC 3.5.1.5)	Sada 等 (1980)
	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC 3.2.1.26)	Adachi 等 (1980)
	青霉素酰化酶 (EC 3.5.1.11)	Szewczuk 等 (1979)
	过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6)	Buchholz 和 Gödelmann (1978)
	D-葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4)	Buchholz 和 Gödelmann (1978), Sada 等 (1981)
	葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)	Moriyama 等 (1980)
	AMP-脱氨酶 (EC 3.5.4.6)	Karube 等 (1977a)
丙烯酸/缩水甘油甲基丙烯酸酯		
乙二醇/2-羟乙基甲基丙烯酸酯 2-羟基乙基甲基丙烯酸酯	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC 3.2.1.26)	Fukui 等 (1978)
	D-葡萄糖异构酶 (EC 5.3.1.5)	Fuuik 等 (1978)
	α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1)	Kumakura 等 (1977), Kaetsu 等 (1979)
	葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.4)	Kaetsu 等 (1979)
	纤维素酶 (EC 3.2.1.4)	Kaetsu 等 (1979)
	α -D-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20)	Kaetsu 等 (1979)
	D-葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4)	Kaetsu 等 (1979)

表 4.1 (续)

材 料	酶	参 考 文 献
κ-卡拉胶	氨基酰化酶 (EC 3.5.1.14)	Tosa 等 (1979)
	天冬氨酸氨裂解酶 (EC 4.3.1.1)	Tosa 等 (1979)
	富马酸水合酶 (EC 4.2.1.2)	Tosa 等 (1979)

中产生的游离基会影响包埋酶的活性。其他材料也已用来包埋各种酶,实例见表 4.1。

4.2.1.2 纤维包埋

Dinelli 和他的同事 (Dindli, 1972; Dinelli 等 1978) 发展了将酶包埋在合成纤维微孔穴中的固定化方法。先将酶分子包埋在纤维中,然后使用类似于纺织工业用的设备和制造人造纤维的传统湿纺技术连续生产。

表 4.2 纤维包埋酶实例

材 料	酶	参 考 文 献
醋酸纤维素	氨基酰化酶 (EC 3.5.1.14)	Bartoli 等 (1978)
	富马酸水合酶 (EC 4.2.1.2)	Marconi 等 (1975)
	葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)	Corno 等 (1972)
	D-葡萄糖异构酶 (EC 5.3.1.5)	Giovenco 等 (1973)
	二氢嘧啶酶 (EC 3.5.2.2)	Snamprogetti (1976)
	β-D-呋喃果糖苷酶 (EC 3.2.1.26)	Marconi 等 (1974a)
	β-D-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.23)	Morisi 等 (1973)
	青霉素酰化酶 (EC 3.5.1.11)	Marconi 等 (1973)
	色氨酸合成酶	Marconi 等 (1974b)
		Zaffaroni 等 (1975)
聚(乙烯醇)和纤维素	二肽酰肽酶 (EC 3.4.14.1/2) (Dipeptidyl peptidase)	Parelin 等 (1977)
	脲酸氧化酶 (EC 1.7.3.3)	Kitano 等 (1980)
	脲酶 (EC 3.5.1.5)	Kitano 等 (1980)

这种方法在几个方面均优于凝胶包埋法。由于使用很细的纤维可获得能结合酶的表面积大,纤维能抗弱酸、弱碱、高离子强度和某些有机溶剂,选用合适的聚合物,还显示出良好的抗微生物作用的能力,同时可固定一种以上的酶,适用于生产固定化的多酶系统。选用的酶应局限于需要低分子量底物、并且不被水不溶性聚合物溶剂失活。最常使用的聚合物是醋酸纤维素,因为它的成本低,又有优良的抗生物和化学试剂能力。用这个方法已成功地固定化了许多酶(见表 4.2)。

4.2.1.3 微胶囊化

将酶包在直径 1—100 μm 的球型半透聚合物膜内即形成微胶囊化酶。这种固定化的酶是物理方法包埋在膜内的,只要底物和产物分子的大小能够通过半透膜,底物和产物分子就能够自由扩散通过膜。

实际上早已知道染料、药物和其他化学品的胶囊化,但是到本世纪 60 年代中才开始将这种方法用于酶 (Chang, 1964)。从第一篇报告发表以来,已用微胶囊化法成功地固定化了许多酶(见表 4.3)。制备微胶囊所采用的材料和方法也有多种(见 B 部分)。

除了上面介绍的主要缺点外,此法的缺点还有:微胶囊化过程中酶偶尔可能失活;需要高浓度的酶;所用的某些微胶囊化方法有可能使酶组合在膜壁上,在使用中会有酶漏出。这种固定化方法的主要优点有:使用较小的体积就可为酶与底物的接触提供极大的表面积;有可能用简单的步骤将多种酶同时固定化。

4.2.2 载体结合

将酶附着在不溶性载体上是酶固定化最古老的 (Nelson

表 4.3 微胶囊化酶实例

材 料	酶	参 考 文 献
相分离法		
硝化纤维素	β -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23)	Wadiak 和 Carbonell (1975)
	天冬酰胺酶 (EC 3.5.1.1)	Chang (1973)
火棉胶	醇脱氢酶 (EC 1.1.9.1)	Campbell 和 Chang (1976)
	苹果酸脱氢酶 (EC 1.1.1.37)	Campbell 和 Chang (1976)
	过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6)	Mogensen 和 Vieth (1973)
	丙酮酸激酶 (EC 2.7.1.40)	Campbell 和 Chang (1975)
	己糖激酶 (EC 2.7.1.1)	Campbell 和 Chang (1975)
	β -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23)	Paine 和 Carbonell (1975)
	脲酶 (EC 3.5.1.5)	Mogensen 和 Vieth (1973)
界面聚合法		
尼龙	β -D-半乳糖苷酶 (EC 3.2.1.23)	Ostergaard 和 Marting (1973)
	天冬酰胺酶 (EC 3.5.1.1)	Mori 等 (1973)
聚脲	天冬酰胺酶 (EC 3.5.1.1)	Mori 等 (1973)
液膜法	葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)	Gregoriadis 等 (1971)
	硝酸盐还原酶 (EC 1.7.99.4)	Mohan 和 Li (1974)
液体干燥法		
乙基纤维素	三酰甘油脂肪酶 (EC 3.1.1.3)	Kitajema 等 (1969)
聚苯乙烯	过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6)	Kitajema 等 (1969)
	三酰甘油脂肪酶 (EC 3.1.1.3)	Kitajema 等 (1969)
	脲酶 (EC 3.5.1.5)	Kitajema 等 (1969)

和 Griffin, 1916) 也是最主要的方法。在考虑酶的固定化时一般首先想到的是这种方法, 也许因为这种方法研究得最多, 但不要认为这是 20 世纪的发现。的确, 正如人们常发现

的,“自然界总是走在前面”,可以说,人体内大部分生物活性分子有时是以固定化形式存在的。

按酶的结合方式不同可把酶的固定化再分为物理吸附、离子结合、螯合或金属结合和共价结合。在这些方法中,选择不溶载体和选择结合方法是最重要的。对于特定的应用,理想的载体应有助于底物结合,降低产物抑制作用,能将表观最适 pH 改变到理想值,不利于微生物生长,容易回收再用等。反应器中使用的载体应在水溶液中稳定,在反应条件下不破坏。载体要有好的机械强度,在高流速、连续操作的固定床式反应器中,压缩程度低。如果固定化酶用在医学上,不应产生免疫反应和凝血反应。Messing (1975) 以载体的性质为依据,提出工业应用载体的选择法。

许多用于酶固定化的有机或无机、天然或合成的载体中,甲基丙烯酸酯和硅橡胶更适合于医学应用,而无机载体能够满足工业应用的需要。对有机载体的主要兴趣是由于它容易结合酶。但是它们的形态稳定性差,在许多情况下,用简单方法不能将这种催化剂再生,因此在许多应用上受到限制。然而,如果使用物理吸附或离子结合技术,这些有机载体还是可用的,如用固定在 DEAE-Sephadex[®] 上的氨基酰化酶工业化生产 L-氨基酸 (Tosa 等, 1966)。但是在一些特殊情况下,已设计用可逆共价键化学法(例如通过二硫键),将酶通过可逆共价结合而再生 (Kennedy 和 Zamir, 1975)。

正如我们已指出的,载体可分为有机载体和无机载体,有机载体又可分为天然载体和合成载体(表 4.4 列出了一些最常使用的载体)。但以这种分类来全面记述载体并不完全合适。表面积和孔度参数会影响酶的截留量,为此需要考虑按形态作进一步分类,如分成有孔载体和无孔载体。表 4.4 所用的分类考虑到形态是比较适当的。

表 4.4 不溶性载体实例

分 类	载 体
天然有机载体	活性炭 琼脂 琼脂糖 清蛋白 纤维素 几丁质(壳多糖) 脱乙酰几丁质(聚氨基葡萄糖) 胶原 葡聚糖 明胶 丝 淀粉
合成有机载体	含丙烯酰胺基的聚合物 丙烯酸/甲基丙烯酸共聚物 马来酸酐共聚物 尼龙 聚苯乙烯 聚乙烯醇
无机载体	氧化铝 皂土 磷酸钙 硅藻土 水合金属氧化物 羟基磷灰石 高岭土 磁铁矿石 浮石 砂 硅胶 氧化钛 氧化锆

4.2.2.1 物理吸附

将 β -D-呋喃果糖苷酶(蔗糖酶或转化酶, EC 3.2.1.26) 吸附在氢氧化铝上 (Nelson 和 Griffin, 1916) 是物理吸附制备固定化酶的最早方法, 也是制备固定化酶最早的方法。此法是以固体表面物理吸附酶为依据, 使酶的水溶液与载体接触, 由截然不同的四种方法中的一种达到酶的吸附:

- (a) 静止法
- (b) 电淀积法
- (c) 反应器上直接吸附法
- (d) 混合浴或振荡浴吸附法

上述四种技术中, 实验室制备固定化酶最常采用的技术是混合浴或振荡浴吸附法, 将载体加到酶液中搅拌混合或于水浴上连续振动, 使酶均匀吸附在载体上。工业上最好采用在反应器中直接吸附的方法。先将要使用的载体装入工艺过程使用的反应器中, 然后将酶加入, 并进行搅动或循环通过反应器。电淀积法是将载体放在酶液中靠近一个电极处, 接通电流, 酶移向载体, 并沉积在载体表面。静止法是四种技术中效率最低的, 并且耗时长。此法不采用搅拌, 除非载体在酶液中放几天。

固定化时酶的构象很少或基本不发生变化, 因此得到的固定化酶的比活, 接近于相应的可溶酶的比活。吸附作用取决于试验条件的变化, 如 pH、溶剂性质、离子强度、酶量和吸附剂量、时间、温度等。由于蛋白质和吸附剂之间的结合力(主要是氢键、范德瓦尔斯力和疏水作用等)比较弱, 需严格控制这些可变因素。

影响酶吸附到固体载体上的量的主要因素, 是在固定化过程中与载体的单位面积接触的酶浓度。固定化酶活性随酶

表 4.5 物理吸附法制备的固定化酶实例

载 体	酶	参 考 文 献
有机载体 苯氧乙酯基纤维素	碱性磷酸酯酶 (EC 3.1.3.1) 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (EC 1.2.1.12)	Dixon 等 (1979) Dixon 等 (1979)
十六烷酰基纤维素 单宁-氨基纤维素	β -D-木糖苷酶 (EC 3.2.1.27) 三酰甘油脂肪酶 (EC 3.1.1.3) 氨基酰化酶 (EC 3.5.1.14) 柚苷酶	Ogamtimein 和 Reilly (1980) Horiati 和 Imamura (1978) Watanabe 等 (1979) Ono 等 (1978)
单宁-TEAE-纤维素 伴刀豆蛋白 A-琼脂糖	支链淀粉酶 (EC 3.2.1.14) 磷酸二酯酶 (EC 3.1.4.1) β -D-呋喃果糖苷酶 (EC 3.2.1.26) 酸性磷酸酯酶 (EC 3.1.3.2)	Ohba 和 Ueda (1986) Schiger 等 (1980) Woodward 和 Wiseman (1978) Torchilin 等 (1977a) Van Etten 和 Saini (1977)
卵磷脂-琼脂糖	D-葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4) 过氧化物酶 (EC 1.11.1.7) 过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6) α -D-葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20)	Mattiasson 和 Borrebaeck (1978) Mattiasson 和 Borrebaeck (1978) Mattiasson 和 Borrebaeck (1978) Mattiasson 和 Borrebaeck (1978)

庚烷基-琼脂糖
己烷基-琼脂糖
辛烷基-琼脂糖
癸烷基-琼脂糖
氨基十六烷基-琼脂糖
氨基十七烷基-琼脂糖
活性炭
玻璃质炭
聚四氟乙烯
几丁质或脱乙酰几丁质

叶绿素酶 (EC 3.1.1.14)
鸟苷酸环化酶 (EC 4.6.1.2)
鸟苷酸环化酶 (EC 4.6.1.2)
黄嘌呤脱氢酶 (EC 1.2.1.27)
鸟苷酸环化酶 (EC 4.6.1.2)
叶绿素酶 (EC 3.1.1.14)
叶绿素酶 (EC 3.1.1.14)
葡萄糖淀粉酶 (EC 3.2.1.3)
D-葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4)
乳酸脱氢酶 (EC 1.1.1.27)
胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4)

Sud'ina 等 (1979)
Garbers (1978)
Garbers (1978)
Tramper 等 (1979)
Garbers (1978)
Sud'ina 等 (1979)
Sud'ina 等 (1979)
Cho 和 Bailey (1979)
Boudillon 等 (1979)
Danielson 和 Siergiej (1981)
Goodman 和 Peanasky (1982)

无机载体
分子筛 4A
沸石
硅胶

胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4)
D-葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4)
胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4)
醇脱氢酶 (EC 1.1.1.1)

Mukherjee 等 (1980)
Pifferi 等 (1980)
Buchholz 等 (1979)
Mickel'sone 等 (1979)

十八烷基硅石
甲基高分散硅胶
氢氧化铝

腺苷脱氨酶 (EC 3.5.4.4)
叶绿素酶 (EC 3.1.1.14)
脲酶 (EC 3.5.1.5)

Melander 和 Horvath (1978)
Sun'ina 和 Galod (1979)
Grunwald 等 (1979)

浓度增加而增加,在较高酶浓度下逐渐接近于饱和值。用吸附法制备固定化酶时,温度和时间是重要参数,特别是用多孔载体时,这两种参数更加重要。因为把酶固定在这样的载体上,扩散是重要因素。

尽管有上述优点,但由于结合力弱,使用时蛋白质会从载体上解吸,使催化活性丧失,并污染产品,这是个很大的缺点。高浓度的盐和底物会增加酶的解吸速度,这样使某些酶只能在短时间内起作用,因此,要把某一酶完全固定化,这样的吸附技术的可靠性是有限的。

用物理吸附法制备的一些固定化酶列于表 4.5。

4.2.2.2 离子结合法

本法主要依靠酶分子与含有离子交换基团的固相载体结合,然而有时也会发生物理吸附。离子结合和物理吸附的主要差别在于酶和载体间连接的强度,虽然离子结合力不如共价结合力强,但比物理吸附的结合力要强。采用离子结合法制备固定化酶和物理吸附所用的操作过程同样简单。

由于结合力的离子性质,在某些情况下酶会象物理吸附法中出现的那样从载体上脱落,即在使用高浓度底物、高离子强度溶液以及 pH 发生变化的情况下会发生酶脱落。然而,由于固定化条件温和,酶分子构象变化很少,因此制备出的固定化酶活性高。

用这种方法固定化的第一个酶是用 DEAE-纤维素离子结合的过氧化氢酶 (EC 1.11.1.6) (Mitz 1956),而第一个工业应用的是固定化在 DEAE-Sephadex® 上的氨基酰化酶 (EC 3.5.1.14) (Tosa 等, 1966),目的是从 N-乙酰基-DL-氨基酸的消旋混合物中生产 L-氨基酸。用离子结合法制备的一些固定化酶列于表 4.6 中。

离子结合法最常使用的载体是用有机支持物制备的离子交换剂,但也有采用具有相同或类似离子交换基团的无机载体(特别是二氧化硅)。有机载体主要是多糖类如葡聚糖和纤维素衍生物或主要是以聚苯乙烯为主体衍生出的合成高聚物。按载体上离子交换基团的类型,可把载体区分为阴离子和阳离子交换剂,这取决于载体与酶上的阴离子(氯或氢氧根离子)或阳离子(氢或钠离子)交换的能力。最常用的阴离子交换剂有 DEAE-, TEAE-和 ECTEOLA-的衍生物,CM-衍生物是最常使用的阳离子交换剂。

4.2.2.3 螯合或金属结合

这是一种相当新的技术,采用过渡金属化合物作为活化载体表面的手段,这样可通过螯合物形成将酶等物质直接偶联,而不必预先制备活化的载体衍生物。使用的载体有玻璃、几丁质、硅藻土、藻酸、明胶,聚-(4 和 5-丙烯基氨基水杨酸)和纤维素(Cardoso 等, 1978; Kennedy 和 Doyle, 1973; Kennedy 和 Epton, 1973; Kennedy 和 Watts, 1974; Kennedy 等, 1974, 1980a)。它们已用于固定酶和抗生素。最近已经对这种方法做了深入的评述(Kennedy, 1979)。用衍生活化载体的办法可将这个过程加以扩展,比如用 5-氨基水杨酸衍生活化的载体,以增加用重氮法结合到载体上的酶等物质的结合程度和结合强度(Cardoso 等, 1978; Kennedy 和 Chaplin, 1979)。

在需要固定化的分子存在下或与这些分子迅速接触之前,形成过渡金属的氢氧化物或氧化物的水合物,这样的载体已用来固定氨基酸、肽、蛋白质(包括酶)、碳水化合物和抗生素(Kennedy 和 Humphreys, 1976; Kennedy 和 Kay, 1976; Kennedy 和 Pike, 1978; Kennedy 等, 1976, 1977a、b, 1980

表 4.6 离子结合法制备固定化酶实例

载 体	酶	参 考 文 献
阴离子交换剂 DEAE-纤维素	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) 磷酸二酯酶 I (EC3.1.4.1) D-葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.18) 菊粉酶 (EC3.2.1.7) 甲醇氧化酶 葡聚糖蔗糖酶 (EC2.4.1.5) 氨基酰化酶 (EC3.5.1.14) Choridazon dihydrodial 脱氢酶 A 和 B D-葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.18) 支链淀粉酶 (EC3.2.1.41) D-葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.18) 酚-2-单加氧酶 (EC1.14.13.7) 葡聚糖蔗糖酶 (EC2.4.1.5) β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Maeda 等 (1979) Aukati 等 (1978) Huitron 和 Limon-Lason (1978) Guiraud 等 (1981) Baratti 等 (1978) Kaboli 和 Reilly (1980) Szwajcer 等 (1981) Keller 等 (1979) Huitron 和 Limon-Lason (1978) Ohba 等 (1978) Huitron 和 Limon-Lason (1978) Kjellén 和 Neujaer (1979, 1980) Kaboli 和 Reilly (1980) Woodward 和 Wiseman (1978)
AE-纤维素 TEAE-纤维素 DEAE-Sephadex®		

QAF-Sephadex®	己糖激酶 (EC2.7.1.1)	Miura 等 (1979)
	肌酸激酶 (EC2.7.3.2)	Miura 等 (1979)
	氮甲酰基磷酸酯合成酶 (EC6.3.4.16/6.3.5.5)	Miura 等 (1979)
DEAE-Bio-Gel®A	酚-2-单加氧酶 (EC1.14.13.7)	Kjellén 和 Neujahr (1979 和 1980)
Amberlite®IRA93	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Klei 等 (1978)
Amberlite®IRA94	β-D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Ooshima 等 (1980)
Amberlite®IRA910	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Klei 等 (1978)
Amberlite®IRA938	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Klei 等 (1978)
阳离子交换剂		
CM-纤维素	青霉素酰化酶 (EC3.5.1.11)	Carleymith 等 (1980)
纤维素磷酸酯	氨酰基-tRNA 合成酶	Yamada (1978)
CM-Sephadex®	β-D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Woodward 和 Wiseman (1978)
SP-Sephadex®	葡聚糖蔗糖酶 (EC2.4.15)	Kaboli 和 Reilly (1980)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Adachi 等 (1978)
葡聚糖硫酸酯	乳酸脱氢酶 (EC1.1.1.27)	Klinov 等 (1979)
Amberlite®IRC-50	胆固醇氧化酶 (EC1.1.3.6)	Cheetam (1979)
	β-D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Ooshima 等 (1980)
Amberlite®IRC-200	粗凝乳酶	Gougeon 等 (1979)

表 4.7 利用整合作用或金属结合制备固定化酶实例

载体	酶	参考文献
有机载体 纤维素	核酸酶 P _i β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26) 果胶裂解酶 (pectin lyase) (EC4.2.2.10) 木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2) 木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2) D-葡萄糖脱氢酶 (EC1.1.1.47) 三酰甘油酯酶 (EC3.1.1.3) D-葡萄糖异构酶 (EC3.5.1.5)	Rokugawa 等 (1979) Woodward 和 Wiseman (1978) Hanish 等 (1978) Kennedy 和 Pike (1979, 1980) Kennedy 和 Pike (1979) Bisse 和 Vonderschmitt (1978) Kobayashi 等 (1980) Bhatt 等 (1979)
DEAE-纤维素 玻璃纤维素 聚丙烯 尼龙 Duolite A-7 聚苯乙烯磺酸 无机载体 氧化铝	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) β -D-木糖苷酶 (EC3.2.1.37) β -D-木糖苷酶 (EC3.2.1.37) 葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3) α -淀粉酶 (EC3.2.1.1)	Allen 等 (1979) Ogumtimein 和 Reilly (1980) Ogumtimein 和 Reilly (1980) Flynn 和 Johnson (1977) Kennedy 等 (1977b) Kennedy 和 White (1979) Hanish 等 (1978)
不锈钢 霍恩闪锌矿石 磁性氧化铁	果胶裂解酶 (EC4.2.2.10)	
多孔玻璃		

Cabral 等 (1981)
 Emery 和 Cardoso (1978)
 Kennedy 和 Watts (1974)
 Cardoso 等 (1978)
 Emery 和 Cardoso (1978)
 Kennedy 和 Chaplin (1979)
 Volkova 等 (1979)
 Bogatskii 等 (1979)
 Kennedy 和 Kay (1977a)
 Kennedy 等 (1976)
 Kennedy 等 (1976, 1981)
 Kennedy 等 (1981)
 Kennedy 等 (1976)
 Kennedy 等 (1976)
 Kennedy 和 Pike (1978)
 Kennedy 等 (1980a)
 Kennedy 等 (1981)
 Kennedy 等 (1976)

葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)
 葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)
 β -D-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21)
 β -D-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21)
 胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)
 链霉菌蛋白酶 (见 EC3.4.24.4)
 葡聚糖酶 (EC3.2.1.11)
 胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)
 葡聚糖酶 (EC3.2.1.11)
 葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)
 D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)
 β -D-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21)
 木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2)
 过氧化物酶 (EC1.11.1.7)
 胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)

多孔硅胶
 钠玻璃
 铅玻璃
 硅胶
 Silochrome
 二氧化钛 (IV)
 由四价钛、四价铬
 三价铁、二价锡
 或三价钒制备的
 水合金属氧化物

a)。使用的金属有三价钛、四价钛和四价锆,它们形成多聚氧化物和氢氧化物。用这个方法制备的固定化酶的实例列于表4.7。一种改进办法是使用四价钛活化载体的烷胺基衍生物,以增强结合力 (Cabrd 等, 1982a、b)。

虽然上述方法描述为螯合作用,但也有一些研究者记述为局部共价结合,像许多固定化甚至共价结合一样,在操作和长期保存过程中发生解吸,因此有人把这种方法归为吸附法。最近螯合作用已有很大的发展,取得了高度的操作稳定性 (Cabrd 等, 1982b)。

4.2.2.4 共价结合

共价结合法是以酶共价结合在水不溶载体上为根据,是研究最多的酶固定化方法之一。其固定化条件的选择要比上述其他载体结合法更困难些,而且方法复杂,又常常采用稍激烈条件。但由于共价键的形成,生成的几乎都是稳定的固定化酶制剂,这些制剂在底物存在或在高离子浓度溶液中,酶不会释放到溶液中。

用共价结合把酶固定在载体材料上,必须只涉及对酶催化作用不重要的功能基团,因此不能使用影响酶结合和酶活性中心的试剂。为防止活性中心重要氨基酸残基发生失活反应,以使制得的固定化酶制剂活性较高,已推出不少方法 (Eaborsky, 1973):


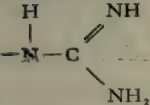
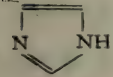
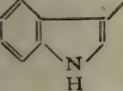
- (1) 在竞争性抑制剂或底物存在下进行酶的共价结合;
- (2) 用可逆共价连接的酶-抑制剂复合物;
- (3) 将化学修饰过的可溶酶,通过新组合进的基团共价结合到载体上;
- (4) 用酶原前体。

各种方式的结合反应及多种具有能够进行共价偶联的功

能基团的载体或对活化产生这种功能基团敏感的载体，使这种方法成为普遍应用的固定化方法。然而除了少数情况外，由于大多数蛋白质组成和结构的复杂性，人们还找不到能够预示适用于特定需要的最佳方法的一般规律。显然，如果酶的一级结构、三级结构和活性中心的结构容易测定，就可以选择不会造成酶失活的有效结合位点和结合方法。

酶是由 20 多种不同氨基酸组成的杂聚物，其中多种氨基酸具有可与载体进行结合的功能基团（见表 4.8）。没有列入这个表的还有具有酰胺基团的氨基酸（L-谷氨酰胺和天冬酰胺），以及具有烃基侧链的氨基酸（L-丙氨酸、L-亮氨酸、L-

表 4.8 蛋白质的活性残基*

残 基	起 源 氨 基 酸
$-\text{NH}_2$	L-赖氨酸的 δ -氨基，N 末端的氨基
$-\text{SH}$	L-半胱氨酸的巯基
$-\text{COOH}$	L-天冬氨酸和 L-谷氨酸的羧基，C 末端羧基
	L-酪氨酸苯酚基
	L-精氨酸的胍基
	L-组氨酸的咪唑基
$-\text{S}-\text{S}-$	L-胱氨酸的二硫基
	L-色氨酸的吲哚基
$\text{CH}_3-\text{S}-$	L-蛋氨酸的硫醚基
$-\text{CH}_2\text{OH}$	L-丝氨酸和 L-苏氨酸的羟基

* 见 Srere 和 Uyeda (1976)。

表 4.9 蛋白质中活性氨基酸残基的平均百分含量*

残 基	百 分 含 量
L-丝氨酸	7.8
L-赖氨酸	7.0
L-苏氨酸	6.5
L-天冬氨酸	4.8
L-谷氨酸	4.8
L-精氨酸	3.8
L-酪氨酸	3.4
L-半胱氨酸	3.4
L-组氨酸	2.2
L-蛋氨酸	1.6
L-色氨酸	1.2

* 见 Dayhoff 和 Hunt (1972)。

表 4.10 氨基酸可参与反应的数目

氨 基 酸	反 应 数 目
L-半胱氨酸	31
L-赖氨酸	27
L-酪氨酸	16
L-组氨酸	13
L-蛋氨酸	7
L-色氨酸	7
L-精氨酸	6
L-谷氨酸	4
L-天冬氨酸	4
L-丝氨酸	0
L-苏氨酸	0

异亮氨酸、L-缬氨酸、L-苯丙氨酸和 L-脯氨酸)和甘氨酸。这是由于在蛋白质分子中它们是相对比较少的,更重要的是它们的疏水性质增加了残基陷入蛋白质内部的机率。即使通过这些残基中的某一个完成了固定化,蛋白质结构也会发生严重破坏,结果使酶活性丧失。表 4.9 列出了许多蛋白质的平均氨基酸组成,这是以残基的相对反应活性为出发点的。更为重要的是要比较每种氨基酸能参与的反应数目 (Means Feemey, 1971) (见表 4.10)。

在 B 部分将详细讨论涉及活性侧链的大多数偶联反应,它们可归入与蛋白质的亲核基团反应的(氨基、巯基或羟基)羧基类型反应。按亲核活性,涉及巯基的反应活性要比涉及氨基或羟基的反应活性高一个或二个数量级。但是,硫酯稳定性比酯稳定性差得多,而酯又比它们所形成的取代的胺稳定性差些。由于这些因素的作用,可将固定化中最常涉及、最便于使用的残基按反应性顺序排列: L-赖氨酸、L-半胱氨酸、L-酪氨酸、L-组氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-精氨酸、L-色氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸和 L-蛋氨酸。

能直接与酶反应的载体功能基团列于表 4.11,表中还附有酶的反应基团。然而,只有少数载体含有直接偶联酶的反应基团,其中包括以马来酸酐为基础的共聚物,甲基丙烯酸酐为基础的共聚物,硝化氟代丙烯酸甲基丙烯酸共聚物,以及碘代烷基甲基丙烯酸酯。大多数载体并不具有这些反应基团,但含有羟基、氨基、酰胺基或羧基,在用于固定化之前需要将这些基团活化。目前已建立的活化反应可分成以下几类:

- (a) 重氮化;
- (b) 形成酰胺键;
- (c) 烷基化和芳基化;
- (d) 形成席夫碱;

表 4.11 共价结合制备固定化酶时载体和酶的功能基团的搭配关系

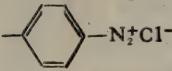
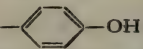
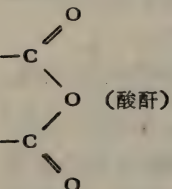
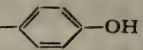
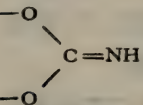
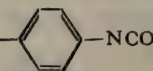
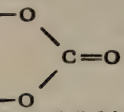
载体的反应基团	酶的反应基团	偶联反应
 (重氮盐)	$-\text{NH}_2$ $-\text{SH}$ 	偶氮联结
 (酸酐)	$-\text{NH}_2$	形成酰胺键
$-\text{CH}_2\text{CON}_2$ (酰基叠氮)	$-\text{NH}_2$ $-\text{SH}$ 	形成酰胺键
 (亚胺碳酸酯)	$-\text{NH}_2$	形成酰胺键
$-\text{R}-\text{NCS}$ (异硫氰酸酯)	$-\text{NH}_2$	形成酰胺键
 (异氰酸酯)	$-\text{NH}_2$	形成酰胺键
$-\text{CH}_2\text{COCl}$ (酰氯)	$-\text{NH}_2$	形成酰胺键
 (环化碳酸酯)	$-\text{NH}_2$	形成酰胺键

表 4.11 (续)

载体的反应基团	酶的反应基团	偶联反应
$ \begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{NH} \\ \\ -\text{CO}_2-\text{C} \\ \\ +\text{NH} \\ \\ \text{R}' \end{array} $ <p>(O-酰基异脲)</p>	$-\text{NH}_2$	形成酰胺键
$ \begin{array}{c} -\text{CO}_2-\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{SO}_3^- \end{array} $ <p>(Woodward 试剂 k 衍生物)</p>	$-\text{NH}_2$	形成酰胺键
$ \begin{array}{c} \text{F} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_3 \\ \quad \\ \text{NO}_2 \quad \text{NO}_2 \end{array} $ <p>(5-氟-2,4-二硝基苯胺)</p>	$-\text{NH}_2$	芳基化
$ \begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{N} \\ // \quad \backslash \\ \text{O}-\text{C} \quad \text{N} \\ \backslash \quad // \\ \text{N} \quad \text{C} \\ \quad \\ \text{Cl} \end{array} $ <p>(三氮唑)</p>	$-\text{NH}_2$	芳基化
$ \begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \backslash \quad / \\ \quad \text{X} \end{array} $ <p>$\text{X} = \text{NH}, \text{O}, \text{S}$ (如环氧乙烷)</p>	$-\text{NH}_2$ $-\text{OH}$ $-\text{SH}$	烷基化
$ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2 $ <p>(乙烯磺酰)</p>	$-\text{NH}_2$ $-\text{SH}$ $-\text{OH}$	烷基化

表 4.11 (续)

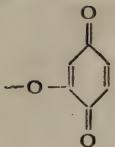
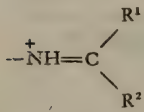
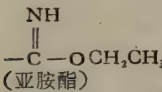
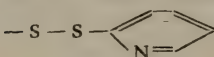
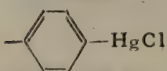
载体的反应基团	酶的反应基团	偶联反应
 (对醌)	$-\text{NH}_2$ $-\text{SH}$ $-\text{OH}$	烷基化
$-\text{CHO}$ (醛)	$-\text{NH}_2$	形成席夫碱
	$-\text{COOH}$ $-\text{NH}_2$	乌基反应
 (亚胺酯)	$-\text{NH}_2$	酰胺化反应
$-\text{CN}$ (氰)	$-\text{NH}_2$	酰胺化反应
 (二硫化物)	$-\text{SH}$	巯基-二硫化物交换
 (有机汞衍生物)	$-\text{SH}$	汞-酶相互作用
M^+ (载体游离基)	E^+ (酶游离基)	γ 射线诱导偶联
$-\text{NH}_2$ (胺基)	$-\text{NH}_2$ $-\text{COOH}$	形成酰胺键 (在缩合剂存在下)
$-\text{CONHNH}_2$ (酰肼)	$-\text{NH}_2$ $-\text{COOH}$	形成酰胺键 (在缩合剂存在下)

表 4.12 重氮偶联制备固定化酶实例(见第 2 部分)

载体	酶	参考文献
有机载体 纤维素	<p>β-D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23)</p> <p>D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)</p> <p>胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)</p> <p>木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2)</p> <p>胃蛋白酶 (EC3.4.23.1)</p> <p>β-淀粉酶 (EC3.2.1.2)</p> <p>β-D-木糖苷酶 (EC3.2.1.37)</p> <p>葡聚糖蔗糖酶 (EC2.4.1.5)</p> <p>酪氨酸酶 (EC1.10.3.1/1.14.18.1)</p> <p>蛋白激酶 (EC2.7.1.37)</p> <p>胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)</p> <p>青霉素酰化酶 (EC3.5.1.11)</p>	<p>Beddows 等 (1980)</p> <p>Beddows 等 (1980)</p> <p>Beddows 等 (1980)</p> <p>Beddows 等 (1980)</p> <p>Beddows 等 (1980)</p> <p>Ohba 和 Ueda (1980)</p> <p>Ogumtimein 和 Reilly (1980)</p> <p>Kaboli 和 Reilly (1980)</p> <p>Iborra 等 (1977)</p> <p>Kozlova 等 (1978)</p> <p>Lai 和 Cheng (1978)</p> <p>Drobnik 等 (1979)</p>
Enzacry®AA	尿酶 (EC 3.5.1.5)	Shemer 等 (1979)
琼脂	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Blassberger 等 (1978)
苯乙烯/马来酸酐	醛脱氢酶 (EC1.1.1.3) <p>磷脂酶 A₂ (EC3.1.1.4)</p> <p>氢化酶 (EC1.18.3.1)</p>	Lee (1978)
缩水甘油甲基丙烯酸酯/ 2-撑二甲基丙烯酸酯		Adamich 等 (1978)
聚丙烯酰胺/尼龙		Hatchikian 和 Monsan (1980)
聚乙烯对苯二甲酸酯		
无机载体 多孔玻璃		
多孔硅胶		

表 4.13 利用形成酰胺键制备固定化酶实例

载体	体	酶	参考文献
酸酐衍生物			
乙烯/马来酸酐		碱性磷酸酯酶 (EC3.1.3.1) 柚苷酶	Zingaro 和 Uziel (1970) Goldstein 等 (1971)
丁二醇乙醚/酸酐		乳酸脱氢酶 (EC1.1.1.27) 胰蛋白酶 (EC3.4.21.4) 胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1) 木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2) 无花果蛋白酶 (EC3.4.22.3) 菠萝蛋白酶 (EC3.4.22.4) 枯草杆菌蛋白酶 (EC3.4.21.14) 枯草杆菌肽酶 链霉菌蛋白酶 (见 EC3.4.24.4) 碱性磷酸酯酶 (EC3.1.3.1) 柚苷酶 柚苷酶	Brümmer 等 (1972) Brümmer 等 (1972) Brümmer 等 (1972) Brümmer 等 (1972) Brümmer 等 (1972) Brümmer 等 (1972) Brümmer 等 (1972) Brümmer 等 (1972) Brümmer 等 (1972) Zingaro 和 Uziel (1970) Goldstein 等 (1971) Goldstein 等 (1971)
甲基乙烯醚/马来酸酐			
异丁基乙烯基醚/马来酸酐 酰基叠氮衍生物 Enzacryl®AH		β -D-木糖苷酶 (EC3.2.1.37) 酪氨酸酶 (EC1.10.3.1/1.14.18.1) 葡聚糖蔗糖酶 (EC2.4.1.5)	Ogumtinein 和 Reilly (1980) Iborra 等 (1977) Keller 等 (1979)

缩水甘油甲基丙烯酸酯/ 乙撑二甲基丙烯酸酯 聚(丙烯酸吗啡) 丙烯酸/异硫氰酸苯乙酯 聚乙烯对苯二甲酸酯 聚丙烯酸 尼龙/聚丙烯酰胺 胶原 多孔玻璃 多孔硅胶 环亚胺碳酸酯衍生物 琼脂	青霉素酰化酶 (EC3.5.11.1) 碳酸酐酶 (EC4.2.1.1) 木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2) 胰蛋白酶 (EC3.4.21.4) β -D-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21) β -D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23) 木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2) L-艾杜糖醇脱氢酶 (EC1.1.1.14) D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4) 天冬氨酸氨基转移酶 (EC2.6.1.1) 对硫磷水解酶 对硫磷水解酶 柠檬酸合成酶 (EC4.1.3.7/28) 酪氨酸酶 (EC1.10.3.1/1.14.18.1) β -D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23) 黄嘌呤脱氢酶 (EC1.2.1.37) 苯酚-2-单加氧酶 (EC1.14.13.7) 羟基类固醇脱氢酶 (EC1.1.1.50 等) 黄嘌呤氧化酶 (EC1.2.3.2)	Drobnik 等 (1979) Epton 等 (1979) Maneche 等 (1978) Blassberger 等 (1978) Manecke 等 (1978) Beddows 等 (1979) Beddows 等 (1979) Paul 等 (1978) Coulet 等 (1980) Arrio-Dupont 和 Coulet (1975) Munnecke (1979) Munnecke (1979) Mukherjee 和 Sreere (1978) Iborra 等 (1977) Danielson 等 (1979) Tramper 等 (1979) Kjellén 和 Neujahr (1979) Carrea 等 (1979) Johnson 和 Coughlan (1978) Tramper 等 (1978)
---	---	--

表 4.13 (续)

载 体	酶	参 考 文 献
纤维素	过氧化物歧化酶 (EC1.15.1.1)	Tramper 等 (1978)
	过氧化氢酶 (EC1.11.1.6)	Tramper 等 (1978)
	D-果糖二磷酸缩酶 (EC4.1.2.13)	Janasik 等 (1978)
	富马酸水合酶 (EC4.2.1.2)	Erekin 和 Friedmann (1979)
	L-马来酸脱氢酶 (EC1.1.1.37)	Erekin 和 Friedmann (1979)
	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Mozhaev 等 (1979)
	共脂肪酶	Martinek 等 (1980)
	三酰甘油脂肪酶 (EC3.1.1.3)	Patton 等 (1978)
	黄嘌呤氧化酶 (EC1.2.3.2)	Patton 等 (1978)
	核酸酶 P _i	Johnson 和 Coughlan (1978)
糊聚糖	L-天冬酰胺 (EC3.5.1.1)	Rokugawa 等 (1979)
	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Jackson 等 (1979)
	聚-D-半乳糖醛酸酶 (EC3.2.1.15)	Mozhaev 等 (1979)
	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Rexova-Benkova 等 (1980)
	黄嘌呤氧化酶 (EC1.2.3.2)	Pittner 等 (1980)
	胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Johnson 和 Coughlan (1978)
	β -淀粉酶 (EC3.2.1.2)	Janasik 等 (1978)
		Maeda 等 (1978)
异氰酸酯和异硫氰酸酯衍生物	聚 2-羟基乙基甲基丙烯酸酯	
	多硫基/4-乙烯基吡啶	
	角闪石	
	玻璃珠	
	纤维素	

Enzacryl®AA	酪氨酸酶 (EC1.10.3.1/1.14.18.1)	Iborra 等 (1979)
聚氨基甲酸酯	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Fukushima 等 (1978)
聚丙烯乙二酸	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Lipatova 等 (1979)
聚乙炔对二甲酸酐	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Blassberger 等 (1978)
缩水甘油甲基丙烯酸酯/乙撑二甲基丙烯酸酯	青霉素酰化酶 (EC3.5.1.11)	Drobnik 等 (1979)
活性炭	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Boudillon 等 (1979)
Sylochrome	链霉蛋白酶 (见 EC3.4.24.4)	Bogatskii 等 (1979)
酰肼衍生物	过氧化氢酶 (EC1.11.1.6)	Schreiner (1966)
Amberlite® IRC-50	葡聚糖酶 (EC3.2.1.11)	Cheetham 和 Richards (1973)
环化碳酸酯衍生物	β -D-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21)	Barker 等 (1971)
纤维素	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Kennedy 和 Zamir (1973)
	胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Kennedy 和 Zamir (1973)
		Kennedy 等 (1973)
碳化二亚胺中间衍生物	核黄素激酶 (EC2.7.1.26)	Merrill 和 McCormick (1979)
琼脂糖	苯酚-2-单加氧酶 (EC1.14.13.7)	Kjellén 和 Neujahr (1978 和 1980)
	β -D-木糖苷酶 (EC3.2.1.37)	Ogamtimein 和 Reilly (1980)
	胆固醇氧化酶 (EC1.1.3.6)	Cheetham (1979)
纤维素	木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2)	Kucera 和 Kuminkova (1980)

表 4.13 (续)

载 体	酶	参 考 文 献
尼龙	胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Kucera 和 Kuminkova (1980)
	α -淀粉酶 (EC3.2.1.1)	Kucera 和 Kuminkova (1980)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Kucera 和 Kuminkova (1980)
	聚-D-半乳糖醛酸酶 (EC3.2.1.15)	Kucera 和 Kuminkova (1980)
尼龙/丙烯酸	乳酸脱氢酶 (EC1.1.1.27)	Daka 和 Laidler (1980)
	苯酚-2-单加氧酶 (EC1.14.13.7)	Kjellén 和 Neujahr (1980)
	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Abdel-Hay 等 (1980)
	胃蛋白酶 A (EC3.4.23.1)	Abdel-Hay 等 (1980)
尼龙/丙烯酸	酸性磷酸酯酶 (EC.3.1.3.2)	Abdel-Hay 等 (1980)
	碱性磷酸酯酶 (EC3.1.3.1)	Abdel-Hay 等 (1980)
	碱性磷酸酯酶 (EC3.1.3.1)	Beddows 等 (1981)
	β -半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23)	Beddows 等 (1981)
丙烯酸/丙烯酸- 缩水甘油甲基丙烯酸- 酯乙撑双甲基丙烯酸 Amberlite® IRC-50	胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Torchilin 等 (1977b)
	青霉素酰化酶 (EC3.5.1.11)	Drobnik 等 (1979)
	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Doshima 等 (1980)
	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Boudillon 等 (1979)
玻璃质碳 活性炭	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Cho 和 Bailey (1979)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.4)	Cho 和 Bailey (1979)
	D-葡萄糖醛酸内酯酶 (EC3.1.1.17)	Cho 和 Bailey (1979)
	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Borchet 和 Buchholz (1979)
玻璃 多孔玻璃	醛脱氢酶 (EC1.2.1.3)	Lee (1978)

表 4.14 用烷基化和芳基化制备固定酶实例

载体	酶	参考文献
卤乙酰胺衍生物	氨基酰化酶 (EC3.5.1.14)	Sato 等 (1972)
氯乙酰胺纤维素	氨基酰化酶 (EC3.5.1.14)	Sato 等 (1972)
溴乙酰胺纤维素	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Maeda 和 Buzuki (1972)
	氨基酰化酶 (EC3.5.1.14)	Sato 等 (1971)
碘乙酰胺纤维素	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Maeda 和 Suzuki (1972)
三氮唑衍生物	磷酸-D 葡萄糖变位酶 (EC2.7.5.1)	Shimizu 和 Lenhoff (1979)
纤维素	D-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (EC1.1.1.49)	Shimizu 和 Lenhoff (1979)
	葡聚糖蔗糖酶 (EC2.4.1.5)	Kaboli 和 Reilly (1980)
滤纸	胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Finlay 等 (1978)
琼脂糖	胰蛋白酶 (EC3.4.24.4)	Finlay 等 (1978)
	乳酸脱氢酶 (EC1.1.1.27)	Finlay 等 (1978)
	α -淀粉酶 (EC3.2.1.1)	Fischer 等 (1978)
聚苯乙烯		
环氧乙烷衍生物	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Švec 等 (1978)
缩水甘油丙基丙烯酸酯	β -D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23)	Friedrich 等 (1980)
聚丙烯酰胺		
乙烯酮衍生物	胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Stambolieva 和 Iurkova (1980)
聚烷基烷基甲基丙烯酸酯	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Stambolieva 和 Iurkova (1980)

表 4.15 通过形成席夫碱制备固定化酶的实例

载 体	酶	参 考 文 献
纤维素	青霉素酶 (EC3.5.2.6)	Klimes 和 Citri (1979)
	β -D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23)	Beddows 等 (1980)
	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Beddows 等 (1980)
	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Beddows 等 (1980)
	木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2)	Beddows 等 (1980)
	胃蛋白酶 A (EC3.4.23.1)	Beddows 等 (1980)
	L-谷氨酸脱氢酶 (EC1.4.1.2)	Sundaram 和 Joy (1978)
	尿酶 (EC3.5.1.5)	Sundaram 和 Joy (1978)
	酸性磷酸酯酶 (EC3.1.3.2)	Torchilin 等 (1977a)
	尿酸氧化酶 (EC1.7.3.3)	Sundaram 等 (1978)
	D-葡萄糖脱氢酶 (EC1.1.1.47)	Bisse 和 Vonderschmidt (1977)
	L-精氨酸酶 (EC3.5.3.1)	Carvajal 等 (1978)
	乳酸脱氢酶 (EC1.1.1.27)	Daka 和 Laidler (1980)
	D-葡萄糖脱氢酶 (EC1.1.1.47)	Sundaram 等 (1979)
	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Abdelattay 等 (1980)
琼脂糖 尼龙		
尼龙/聚乙烯 尼龙/聚丙烯腈		

Abdel-Hay 等 (1980)
 Abdel-Hay 等 (1980)
 Abdel-Hay 等 (1980)
 Matsumoto 等 (1980)
 Carbysmith 和 Lilly (1979)
 Spettoli 等 (1980)
 Leuba 和 Widmer (1979)
 Hirano 和 Miura (1979)
 Hirano 和 Miura (1979)
 Stanley 等 (1978)
 Iyengar 和 Rao (1979)
 Ogumtimein 和 Reilly (1980)
 Klyosov 和 Gerasimar (1979)
 Carleysmith 等 (1980)
 Cheetham (1979)
 Svec 等 (1978)
 Drobnik 等 (1979)
 Lai 和 Cheng (1978)
 Beitz 等 (1980)
 Rodinov 等 (1977)

胃蛋白酶 A (EC3.4.23.1)
 酸性磷酸酯酶 (EC3.1.3.2)
 碱性磷酸酯酶 (EC3.1.3.1)
 胆碱氧化酶 (EC1.1.3.17)
 葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)
 马来酸脱氢酶 (EC1.1.1.37)
 β -O-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23)
 胃蛋白酶 A (EC3.4.23.1)
 碱性磷酸酯酶 (EC3.1.3.1)
 胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)
 脲酶 (EC3.5.1.5)
 β -D-木糖苷酶 (EC3.2.1.37)
 葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)
 青霉素酰化酶 (EC3.5.1.11)
 胆固醇氧化酶 (EC1.1.3.6)
 葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)
 青霉素酰化酶 (EC3.5.1.11)
 胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)
 丙酮酸脱羧酶 (EC4.1.1.1)
 甲酸脱氢酶 (EC1.2.1.2)

聚丙烯腈

聚氨基葡萄糖
 (脱乙酰基几丁质)

几丁质

Amberlite® XAD-7

缩水甘油甲基丙烯酸酯

苯乙烯/马来酸酐

聚氨基苯乙烯

多孔玻璃

表 4.15 (续)

载 体	酶	参 考 文 献
多孔硅胶	脲酶 (EC3.5.1.5)	Mattiasson 等 (1978)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Lee 等 (1980)
	醇脱氢酶 (EC1.1.1.1)	Johnson (1978)
	黄嘌呤氧化酶 (EC1.2.3.2)	Johnson 和 Coughlan (1978)
	乙酰酯酶 (EC3.1.1.6)	Konecny 和 Sieber (1980)
	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Monsan (1978)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Bohnekamp 和 Reilly (1980)
	β -淀粉酶 (EC3.2.1.2)	Bohnekamp 和 Reilly (1980)
	氢化酶 (EC1.18.3.1)	Hatchikian 和 Monson (1980)
	葡聚糖蔗糖酶 (EC2.4.1.5)	Kaboli 和 Reilly (1980)
	β -D-木糖苷酶 (EC3.2.1.37)	Ogumtimein 和 Reilly (1980)
	过氧化氢酶 (EC1.11.1.6)	Chang 和 Reilly (1978)
	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Chang 和 Reilly (1978)
	D-葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.5)	Chang 和 Reilly (1978)

硅胶
砂
砖
氧化铝
角闪石

氧化钛
纯铁粒

酸性白土
玻璃珠

胃蛋白酶 A (EC3.4.23.1)
胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)
乙酰酯酶 (EC3.1.1.6)
葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)
醇脱氢酶 (EC1.1.1.1)
黄嘌呤氧化酶 (EC1.2.3.2)
尿酸氧化酶 (EC1.7.3.3)
葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)
核糖核酸酶 (EC3.1.27.2 等)
胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)
胰蛋白酶 (EC 3.4.21.4)
核糖核酸酶 (EC 3.1.27.2 等)
溶菌酶 (EC3.2.1.17)
D-氨基酸氧化酶 (EC1.4.3.3)
D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)
过氧化氢酶 (EC1.11.1.6)
氢化酶 (EC1.18.3.1)

Voivodov 等 (1979)
Pavanakrishnan 和 Bose (1980)
Konecny 和 Sieber (1980)
Allen 等 (1979)
Johnson (1978)
Johnson 和 Coughlan (1978)
Johnson 和 Coughlan (1978)
Flynn 和 Johnson (1978)
Dale 和 White (1979)
Halling 等 (1979)
Halling 等 (1979)
Halling 等 (1979)
Halling 等 (1979)
Parkin 和 Hultrin (1979)
Wasserman 等 (1980)
Wasserman 等 (1980)
Epton 等 (1972)

- (e) 乌基反应；
- (f) 酰胺化反应；
- (g) 巯基-二硫化物变换反应；
- (h) 汞-酶相互作用；
- (i) γ 射线诱导偶联。

上述每类方法将在 B 部分详细描述；用这些技术固定化酶的主要实例列于表 4.12—4.15。

4.2.3 交联

这种方法是通过双功能或多功能试剂在酶分子间形成共价键，导致二维交联聚集体生成。这种聚集体完全不溶于水，并且不需要使用水不溶性载体。这种方法是在形成多元共价键的条件下，将适量的交联剂加到酶溶液中。除了一级、二级、三级结构已经了解得很清楚的酶，对其他每个系统都需用试验的方法确定最适固定条件，以便得到不溶性好、酶活力高的交联固定化酶。

交联使用的试剂具有两种相同的功能基团（均同双功能试剂），或者具有两种或两种以上不同功能基团（杂或非均一多功能试剂）。后者在将酶结合到不溶性载体上的应用要比在分子间交联反应中使用的更普遍。经常使用的主要试剂有以下几种：

- (a) 通过与赖氨酸残基形成席夫碱的羰基功能基团；
- (b) 通过重氮偶联反应与 L-赖氨酸、L-组氨酸、L-酪氨酸、L-精氨酸或 L-半胱氨酸残基反应的重氮基团；
- (c) 形成酰胺键（肽键）的异氰酸酯基团；
- (d) 经烷基化反应与亲核性残基反应的烷基碘化物；
- (e) 通过烷基化作用与 L-半胱氨酸残基反应的碘乙酰胺。

表 4.16 分子间文联法制备的固定化酶实例

交 联 剂	酶	参 考 文 献
戊二醛	醇脱氢酶 (EC1.1.1.1) 谷氨酸脱氢酶 (EC1.4.1.2) 青霉素酰化酶 (EC3.5.1.11) 儿茶酚 1, 2-双加氧酶 (EC1.13.11.1) 苯酚-2-单加氧酶 (EC1.14.13.7) 磷酸酯酶 (EC3.1.3.1/2) 羧肽酶 A (EC3.4.17.1) 核糖核酸酶(胰的) (EC3.1.27.5) 羧肽酶 A (EC3.4.17.1) 核糖核酸酶 (EC3.1.27.5) 羧肽酶 A (EC3.4.17.1) 支链淀粉酶 (EC3.2.1.41) 蔗糖酶 (EC3.2.1.26) β -D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23)	Sadini 等 (1974) Ahn 等 (1975) Carleysmith 等 (1980) Neujahr (1980) Kjellén 和 Neujahr (1979) Tashiro 和 Matsuda (1978) Quiocho 和 Richards (1964 和 1966) Avrameas 和 Termynck (1969) Quiocho 和 Richards (1966) Marfey 和 King (1965) Quiocho 和 Richards (1966) Ohba 等 (1978) Negoro (1972) Olson 和 Stanley (1979)
1, 5-二氟-2, 4-二硝基苯		
重氮联苯胺		
砒酸		

用这种方法进行固定化反应的第一篇报道是用戊二醛交联羧基酶 A(EC 3.4.17.1) (Quioco 和 Richards, 1964), 得到了一种分子间交联的固定化酶, 其形成的键是不可逆的, 而且在极端 pH 和温度下仍保留活性。影响这种方法应用的主要缺点是: 反应难于控制; 需要使用大量的酶; 许多酶由于酶活性中心参与键的形成或位于交联聚集体的中心, 不能与底物接触而丧失活性; 制备出的产品具有凝胶性质等。表 4.16 列出其他一些用此法制备的固定化酶。

4.2.4 固定化的可溶性酶

上述所有的酶固定化方法都涉及酶的修饰作用, 或改变酶的微环境, 引起 pH、温度曲线和动力学性质的改变, 结果常比相应的游离酶活性低。为了使酶仍以天然状态(可溶的)长期连续使用, 设计出利用物理方法将酶限制在半透膜、中空纤维或超滤膜中。这些方法也可能涉及化学作用, 但并不重要。

4.2.4.1 无酶衍生作用的固定化

此法所使用的膜等材料能使产物分子透过, 有时底物分子也可以通过, 但酶分子不能透过。由于酶没有发生化学修饰, 因此这种方法允许在连续反应器中研究可溶酶及其操作稳定性。

这种方法特别适用于转化高分子量的水溶性底物和水不溶性底物, 由于可溶酶能与底物密切接触, 这种类型的底物会达到有效的转化, 而不溶性的固定化酶对同样底物的催化效率通常较低。

这种方法还有另外一些优点: 方法简便, 只需将酶溶液加到半透膜的一侧即可把酶固定化; 可将许多酶同时固定化; 由于膜的选择性可有选择地控制底物和产物; 表面积与体积

比大(中空纤维);防止微生物接近酶;选用结构合适的膜可避免酶的漏出;与其他固定化方法相比膜式反应器在装载酶、操作、清洗、消毒和再生等方面均比较容易。

然而,此法也有一些固有的缺点:膜的渗透阻抗使反应速度降低;由于膜对底物的吸附作用,使用浓度很低的底物有困难;强烈搅拌或高切变力(超滤膜室)作用下酶可能会失活;另外为达到高转化需要仔细控制低分子量底物的存留时间。

表 4.17 列出了用此法制备固定化酶的一些实例。

表 4.17 固定化的可溶酶实例

方 法	酶	参考文献
超滤	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Cantarella 等 (1977)
膜法	酰胺酶 (EC3.5.1.4)	Wandrey 等 (1979)
	酸性磷酸酯酶 (EC3.1.3.2)	Greco 等 (1980)
	β -D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.23)	Roger 等 (1976)
中空纤维装置	α -D-半乳糖苷酶 (EC3.2.1.22)	Silman 等 (1980)
	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Silman 等 (1980)
	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Besserlich 等 (1980)

4.2.4.2 具有酶衍生作用的固定化

有几篇报道 (Narshall 和 Rabinowitz, 1976; Vgarova 等, 1977; Vegarud 和 Christensen, 1977) 描述了用低分子或高分子化合物对酶进行化学修饰而又不发生不溶化作用的方法。虽然用低分子量化合物进行酶修饰的用处有限,但在

某些情况下, 它可很好地用于解决特殊问题, 比如, 用低分子量试剂将酶酰化具有稳定化作用 (Vgarova 等, 1977)。

在制备水溶性酶-聚合物的缀合物时, 采用的反应与将酶化学偶联到不溶性聚合物上的反应相似。用以下方法中的一种即可将酶结合到可溶性聚合物上; 酶与活化的可溶性聚合物反应, 或将酶与活化的不溶性载体反应, 然后将形成的酶-聚合物的缀合物溶解; 或将单体与酶共聚合。

Katehalski 和 Sela (1958) 及 Glazer 等 (1962) 最先报道了水溶性衍生酶的制备, 并说明了聚合物链的静电电位与酶的最适 pH 变化之间的关系。另一些报道 (Marshall 和 Rabinowitz, 1976, Vengarud 和 Christensen, 1977) 也提到制备水溶性酶衍生物, 目的是为了增加酶分子的有效体积, 以免从膜装置中释放出来, 改善酶的机械性能和操作稳定性。

事实上, 在膜装置内使用可溶性天然酶时存在的缺点是长期使用酶的稳定性差, 及为了防止酶损失在某些应用中需要限定膜的孔率。如果使用水溶性的酶-聚合物的缀合物, 这些缺点就可以克服, 因为允许选用较高孔率的膜, 使产物迅速扩散出去, 进而减少最终产物的抑制作用。同时还可通过将酶附着在多糖上 (Solomon 和 Levin, 1974), 或在酶周围形成特定静电性质的稳定环境 (Wykeo 等, 1971) 来增加酶的稳定性。

使用可溶性衍生酶的另一个优点, 是可用于水解大分子底物或水不溶性颗粒状底物(如纤维素), 而用传统的固定化酶处理这样的底物总是伴随着严重的扩散阻力。

制备这些水溶性缀合物的主要缺点是, 聚合物活化和与酶反应后必须进行十分费力的分离纯化, 必须用沉淀、凝胶过滤、超滤或透析等方法分离掉未反应的酶和过量的试剂。

一些衍生酶的实例列于表 4.18。

表 4.18 可溶性酶衍生物实例

可溶性载体	酶	参考文献
葡聚糖	α -淀粉酶 (EC3.2.1.1)	Charles 等 (1974)
	胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Vergarud 和 Christensen (1977)
	β -D-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21)	Vergarud 和 Christensen (1977)
	溶菌酶 (EC3.2.1.17)	Vergarud 和 Christensen (1977)
	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Marshall 和 Rabinowitz (1976)
乙烯马来酸酐共聚物	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Soloman 和 Levin (1974)
苯乙烯马来酸酐共聚物	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Soloman 和 Levin (1974)
海藻酸	溶菌酶 (EC3.2.1.17)	Charles 等 (1974)

4.2.5 其他方法

虽然用早期描述的任何一种方法都可将酶固定化,但有时将几种专一方法相结合起来制备固定化酶会更有效。最常用的是酶固定化后再进行交联,例如,通过吸附固定化的酶的再交联,因为只用吸附法制备的固定化酶的工作稳定性差。这种双重固定化方法消除了只用多功能试剂交联所得制剂机械性能差的缺点。采用交联吸附酶的方法,可形成单层固定化酶。然而,实验条件很重要,必须确保酶在载体上有良好的吸附,并且单个胶体微粒必须不发生聚集。

利用分子内交联反应,将酶附着在膜上,或使酶分子互相附着可以改进包埋法固定化的效率。包埋法得到的产物用双功能试剂处理,通常使用戊二醛,也可使用螯合法或金属结合

表 4.19 制备固定化酶的各种方法实例

方 法	酶	参 考 文 献
包埋和交联 (胶原)	脂肪酶 (EC3.1.1.3)	Sato 等 (1977)
	尿激酶 (EC3.4.21.31)	Karube 等 (1977b)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Gondo 和 Koya (1978)
	天冬酰胺酶 (EC3.5.1.1)	Morikawa 等 (1978a)
	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Gondo 等 (1980)
	D-葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.5)	Gondo 等 (1980)
	醇脱氢酶 (EC1.1.1.1)	Morikawa 等 (1978b)
	乳酸脱氢酶 (EC1.1.1.27)	Bollmeier 和 Middleman (1979)
	尿酶 (EC3.5.1.5)	Bollmeier 和 Middleman (1979)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Kennedy 和 Kalogerakis (1980)
包埋和交联 (明胶)	尿酸氧化酶 (EC1.7.3.3)	Remy 等 (1978)
	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	O'Souza 和 Nadkarni (1981)
	L-谷氨酸脱氢酶 (EC1.4.1.2)	Barbotin 和 Breuil (1978)
共交联(白蛋白和戊二醛)		Barbotun 和 Thomasset (1979)

2-乙酰胺基-2-脱氧- β -D-己糖苷酶 (EC3.2.1.52)	Yeung 等 (1979)
儿茶酚-1, 2-双加氧酶	Neujahr (1980)
尿酶 (EC3.5.1.5)	Vallin 和 Tran-Minh (1979)
α -类固醇脱氢酶	Legoy 等 (1980)
β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26)	Ludolph 等 (1979)
胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Halling 和 Dunnill (1979)
D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Krishnaswamy 和 Kittrel (1978)
D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	Wassermann 等 (1980)
过氧化氢酶 (EC1.11.1.6)	Wassermann 等 (1980)
β -D-葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.21)	Gray 等 (1974)
葡聚糖酶 (EC3.2.1.11)	Chaplin 和 Kennedy (1976)
	Kennedy 和 Kay (1977b)
吸附和交联 (胶原 + 戊二醛)	
吸附和交联 ($\text{NiO} \cdot \text{FeO}_2 \cdot \text{Mn} \cdot \text{Zn}$ 纯铁粒)	
吸附和交联 (硅藻土 + 戊二醛)	
吸附和交联 (玻璃 + 戊二醛)	
有机包复层的无机载体	

表 4.19 (续)

方 法	酶	参 考 文 献
离子结合和衍生作用	木瓜蛋白酶 (EC3.4.22.2)	Kennedy 等 (1980b) Gray 等 (1974)
	尿酶 (EC3.5.1.5)	Kennedy 等 (1977c)
	胆碱酯酶 (EC3.1.1.8)	Kennedy 等 (1977c)
	过氧化物酶 (EC1.11.1.7)	Kennedy 等 (1977c)
	过氧化氢酶 (EC1.11.1.6)	Gray 等 (1974)
	尿酸酶 (EC1.7.3.2)	Gray 等 (1974)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Gray 等 (1974)
	α -淀粉酶 (EC3.2.1.1)	Kennedy 等 (1977b)
	胰凝乳蛋白酶 (EC3.4.21.1)	Bessmertnaya 和 Antonov (1973)
	胰蛋白酶 (EC3.4.21.4)	Yarovaya 等 (1975)
	葡萄糖淀粉酶 (EC3.2.1.3)	Soloman 和 Levin (1974)

法进行有效地交联,从而增加最终产物的机械稳定性并能耐受操作条件 (Kennedy 和 Kalogerakis, 1980)。

为消除交联反应引起的扩散效应造成的酶活性损失,用戊二醛将低浓度的酶交联到富含 L-赖氨酸残基的非酶蛋白质上(如牛血清蛋白),然后用凝胶包埋法使制得的固定化酶不溶化。Broun (1976) 设计的这种方法称为共交联法,这种方法由于化学性质的缘故,在只用戊二醛交联达不到使酶不溶化的情况下特别有用。

用上述方法(见 4.2.2.4)或用具有结合蛋白质所需的功能基团的有机材料包复在无机载体上,也能使无机载体具有共价结合酶的能力。已经试用了几种方法,包括使用 1,3-二氨基苯聚合物 (Kennedy 和 Kay, 1977; Kennedy 等, 1977b, 1977c, 1980b), 氨基苯甲酸-甲醛树脂 (Chaplin 和 Kennedy, 1976), 以及烷胺基衍生物 (Royer 和 Uy, 1973)。

酶的可溶性衍生物的形成(如 4.2.4.2 所述)也可作为固定化的中间步骤,就是通过一些方法使酶对共价结合敏感,例如,通过结合在蛋白质上的碳水化合物组分 (Salornon 和 Levin, 1974), 或者通过结合在蛋白质上的高电荷残基使酶对离子结合敏感 (Wykeo 等, 1971)。在后一种情况下,是将酶附着在水溶性马来酸酐和丙烯酸共聚物或马来酸和乙烯共聚物上,而生成的衍生物以一种不可逆的方式牢固地结合到离子交换剂上。

用这些方法制备的许多固定化酶实例列于表 4.19。

4.3 固定化方法的选择

虽然发展了许多固定化技术,并用于多种酶,但现在还没有一种能适合所有应用和所有酶的全能方法。因为各种酶的

化学特性和组成差别很大,底物和产物性质不同,产物的用途也不一样。因此,对固定化酶的每一种应用来说,必须找到既简便又廉价的方法,并且在给出产品的同时要很好保留酶活性,还要有高的工作稳定性。

从载体材料特性和已使用的各种方法的效果所获得的大量资料,有可能归纳出选用固定化方法的一般依据,并可作为某些特殊情况下使用的原则,但并不能保证一定会成功。因此,必须通过多种方法的比较试验才能找出适合的方法。表4.20 给出了可供选用的各种固定化方法的优缺点。

表 4.20 各种固定化技术特性的比较

特 征	交 联	物理吸附	离子结合	螯合成 金属结合	共价结合	包埋
制备	中等	简单	简单	简单	难	难
结合力	强	弱	中等	中等	强	中等
酶活性	低	中等	高	高	高	低
载体再生	不能	可能	可能	可能	极少用	不能
固定化成本	中等	低	低	中等	高	中等
稳定性	高	低	中等	中等	高	高
应用性	无	有	有	有	无	有
保护酶免受微生物作用	可能	无	无	无	无	有

当固定化作用伴随有化学反应发生时,如在交联和共价键合法中那样,必须使蛋白质分子构象变化保持在最低限度,以避免由于固定化反应涉及到活性中心而发生部分失活。这就要求使用尽可能温和的条件。然而,用化学手段将酶成功地固定化,得到的固定化酶具有高的工作稳定性,这是由于酶分子间(交联法)和酶与载体间(共价键合法)的结合力强,而且所形成的键抗底物或盐溶液的破坏。交联法一般不适合大规模工业应用,因为得到的最终产物缺乏机械稳定性,而共价键合到有机材料上的酶极难再生,因此在大规模工业应用上也

不会对它感兴趣。

物理吸附、离子结合和螯合或金属结合法条件温和,因而具有吸引力的固定化方法。然而,其结合力通常要比化学结合法形成的结合力弱,工作稳定性也较低。这是由于反应介质的离子浓度、pH、底物浓度或温度的变化会使酶从载体上脱落。抛开这些缺点,由于它能再生,这些技术用于工业是有可能的。

采用包埋法固定化有可能保留高活性。这是由于酶和载体间没有结合作用,但由于大分子量底物和大分子产物的扩散效应会使酶活性受到限制。因此包埋法只限于小分子量底物分子和产物分子的反应。

4.4 固定化酶性质的概述

要充分利用各种现有的技术,必须了解酶在固定化中的物理和化学性质的变化。已经发现载体材料和酶本身作用产生的产物所造成的微环境会改变酶的稳定性和它们的动力学性质。

4.4.1 稳定性(见 A 部分 3.27)

酶的稳定性会由于微环境的稳定作用而增加,也会由于微环境对酶有变性作用而降低。有人认为,某些载体的疏水微环境是引起水溶液中悬浮贮存时稳定的酶在冷冻干燥时损失活性的原因。在某些情况下,冷干前把某种物质添加到溶液中,可防止丧失稳定现象的发生,这些添加物能够克服疏水作用的影响,并提供亲水性的微环境。山梨醇就是这类添加物之一(Kennedy 和 Kay, 1976)。在进行蛋白水解酶固定化时,应设法使酶分子间相互隔离,避开相互作用,降低由于

自溶造成的酶自身失活。已报道了许多系统,可使固定化蛋白酶在 4°C 下保存几个月而没有明显的活性损失。

使用无机载体(如玻璃或陶瓷材料)代替有机聚合物能提高许多固定化酶的稳定性,这是由于无机载体有较高的空间稳定性 (Messing, 1974)。利用磺酰胺键将酶共价键合在无机载体上的产物,其稳定性一般不如用偶氮键偶联的产物 (Weetull, 1970)。

固定化也可以改变酶对变性剂的稳定性。许多报道提到酶的稳定性增加(也许稳定性降低的未报道)。包埋法制备的固定化酶的产物抑制作用可能增加,这是由于膜扩散效应阻碍了产物的尽快除去。固定化酶的热稳定性可能提高也可能降低,有关载体对热稳定性的影响的报道很少。

4.4.2 动力学性质(见 A 部分第 3 章)

酶固定化时,由于固定化过程中酶蛋白分子的变性常使其比活性降低。固定化后,酶可能处于与溶液状态相差极大的载体微环境的影响之下。微环境是由载体材料的物理化学性质决定的,也可能由于酶反应所涉及的底物分子或产物分子与载体基质的相互作用造成的。

许多酶在固定化后最适 pH 会发生改变。比较结合在载体材料上的酶和游离的溶解状态的酶在不同 pH 下的活性就会发现,如果酶固定在带负电荷的载体上,最适 pH 向碱性方向移动,即在较碱性条件下,固定化酶达到最高的酶活性。这种效应是由于载体上带有的负电荷基团吸附上一薄“层”带正电荷的氢离子引起的。这样就给结合酶创造了一种微环境,这种微环境中的氢离子浓度比实际测定的周围溶液中氢离子浓度高(pH 低) (Katchalski 等, 1971)。同样,带正电荷的载体材料制备的固定化酶的最适 pH 向酸性方向移动(图 4.2)。在

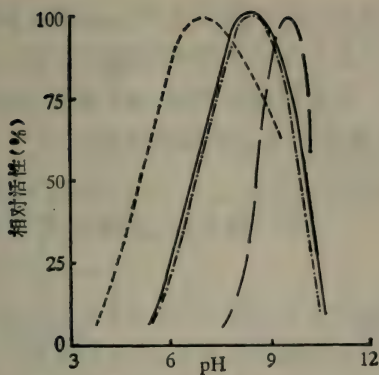


图 4.2 微环境对固定化酶 pH-活性的影响。

—— 可溶酶, - - - - 固定化酶;阳离子载体
 - · - · - 固定化酶;中性载体; - - - - 固定化酶;阴离子载体。
 (引自 Kennedy, J. F 和 White, C. A., 1983)。

高离子强度下这种效应消失。当使用的底物与载体电荷相反时,表观米氏常数大约降低一个数量级以上。这种效应也只在低离子强度下才会发生。将电荷的 Maxwell Bottmann 分布分别代入静电位处理和 Michaelis Menten 方程,可对这两种效应进行数学处理。

底物从整体溶液向固定化酶微环境的扩散,可能是影响酶反应速度的主要因素。假定扩散薄膜 (Lilly 等, 1968) 覆盖在固定化酶表面上,则扩散薄膜内的底物浓度低于整体溶液内的底物浓度。底物从整体溶液到达固定化酶的速度影响了扩散薄膜的厚度,进而决定了酶附近的底物浓度和反应速度。这种扩散控制效应在填充床式反应器中表现为反应速度随底物溶液流动速度或搅动速度而变化。底物分子量的影响是极明显的,大分子扩散速度较慢,而且更易受到与载体材料间空间位阻的相互作用。固定化酶对大分子量底物的相对活性一般要低于低分子量底物的活性。在某些情况下,即在反

应混合物中抑制剂的分子量很大时,这种扩散控制可能是有好处的,可以降低大分子抑制剂对酶的作用。当反应产生带电荷的产物时,会引起微环境的 pH 变化,进而改变 pH-活性曲线,这时扩散作用也会影响微环境。

4.5 酶反应器概述

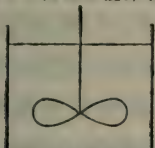
在固定化酶的许多应用中(见 4.6),工业应用大概是最重要的领域,并且也是报道最活跃的一个领域。为了最有效地利用固定化酶的各种性质和底物与产物的特性,发展建立了许多类型的反应器,并试图对酶反应器进行分类(Wingard 等,1976; Wiseman, 1978)。

4.5.1 批式反应器

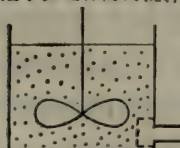
在工艺过程中使用可溶酶时,最常采用的反应器类型是批式反应器。反应完成后一般不能从反应混合物中回收可溶酶,因而不能再使用。酶固定化的主要目的之一是酶的回收和再用。在批式反应器中应用固定化酶,常常还包括一种分离酶的附加工艺。在回收过程中,固定化酶可能有明显损失,也会出现由于材料失水干燥等过程引起的酶活性损失。由于这一原因,传统的搅拌罐式反应器(见图 4.3)的使用只限生产少量的精细化学产品。

传统的搅拌罐反应器由容器、搅拌器组成,经常在容器壁上装上挡板,以促进反应物的混合。由于许多固定化酶,特别是附着在无机载体上的固定化酶,在搅拌罐内受机械应力会破损。为解决这些问题,使固定化酶可以应用,已经对设计作了改进,将固定化酶装在罐式反应器搅拌器翼片或挡板的“篮子”内(见图 4.3)。

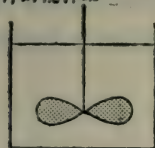
a) 适于可溶酶的搅拌罐



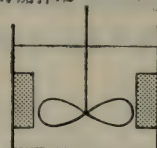
b) 适于固定化酶的搅拌罐



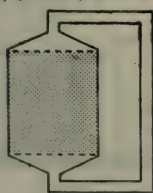
c) 装有固定化酶的蓝式搅拌翼片的搅拌罐



d) 装有固定化酶的蓝式挡板的搅拌罐



e) 全循环填充床反应器



f) 全循环流态化床反应器



图 4.3 批式反应器类型。

另一种可选择的方法是将连续反应器(见 4.5.2)改良为批式循环或全循环式(见图 4.3)。这种最常用的如填充床式或流态化床式的反应器,对于底物溶液一次通过反应器不能达到理想转化的反应是十分有用的。这种反应器的优点在于使用高流速,可降低外部质量传递效应,而且反应器价格低廉。

4.5.2 连续反应器

固定化酶的引入使酶催化反应的连续操作成为现实,随之而来的优点是可实现自动化控制,易于操作,而且容易控制产品质量。依据相对的流动方式,连续反应器可分为两种基本类型:连续给料的搅拌罐式反应器和(活)塞流式反应器。

连续给料搅拌罐式反应器是由一个有底物进口和产物出

口的搅拌罐组成,转化率由反应器体积、通过反应器的流速、固定化酶的量 and 活性来控制。为使固定化酶保留在反应器内,可采用以下方法:对流出的产物流进行过滤;附带一个沉降步骤;将酶固定化在磁性颗粒上,使其保留在磁场内(也可用磁场搅拌磁性颗粒);或将酶固定在搅拌器翼片或挡板上(见图 4.4)。将超滤过程与反应器相结合,可允许可溶性固定化酶保留在反应器内,这对于不溶的或胶态的底物是有好处的。

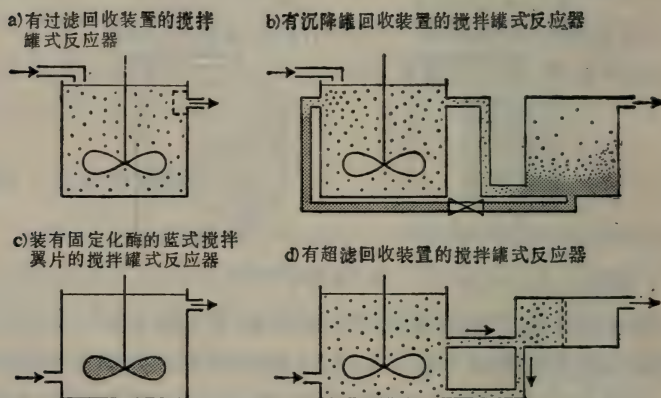


图 4.4 连续流动搅拌罐式反应器类型。

塞流式反应器是利用固定化酶可以直接填充在柱式反应器中的特点而产生的。然后把底物直接通过固定化酶床,从流出口可得到产物。转化率是通过由底物流速和反应器容积控制的存留时间来控制的。许多反应器的设计都是可采用的(图 4.5),这些设计满足了固定化酶需要的物理形状。在填充床式反应器内,催化剂以高柱形、扁平床形或滤床形保留在柱中,而底物可以从柱上部,也可以从底部采用泵输入。而在流态化床式反应器内,催化剂是松散的装在柱内,底物从柱的底

部进入。底物通过系统的流速要达到一种平衡状态，这种状态下的速度能与柱内的固定化酶进行有效的混合，同时又不致使催化剂冲出反应器。如果将酶固定在密度高于反应混合物密度的载体上，可使这个系统得到改善。这个系统适于处理不溶性和胶态化的底物。

填充床式反应器发展形成一类膜和中空纤维反应器，这些反应器内的膜或纤维的壁对酶分子具有半透性（图 4.5 是

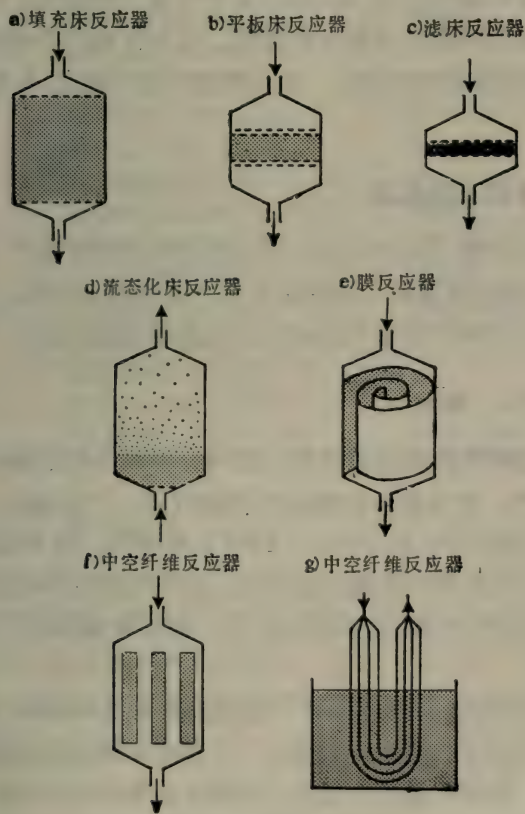


图 4.5 连续流动反应器类型。

这类反应器的类型图)。这两种类型的反应器中,底物透过膜进入膜内与酶作用,产生的产物返回透过膜进入整体溶液中;或是底物透过膜到另一侧与固定在这一侧的酶作用,而产物扩散通过膜返回整体溶液中。

4.6 应用及发展趋势

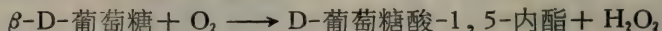
固定化酶在分析、医药、工业上已有广泛应用,但多数还没有发展到可取代老技术的程度。以下介绍的各种应用是用来说明它们的开发程度。更详细的内容可参见 B 部分第 3 章。

4.6.1 分析上的应用

与具有潜力的分析应用相关的固定化技术获得了许多最新进展,这些进展使几种商品化生产系统推向市场。Carr 和 Bowers (1980) 对这个领域作了相当详细的评述。

4.6.1.1 酶电极

有关酶电极的报道很多,但只有少数得到普遍应用或商品化生产。有关酶电极的原理可通过第一个制备的 D-葡萄糖电极 (Vpdike 和 Hicks, 1967) 来阐明。将 D-葡萄糖氧化酶固定化在聚丙烯酰胺凝胶上,用一片醋酸纤维素膜将固定化酶固定使它围绕在氧电极上。固定化酶催化下面的反应:



由氧电极测定溶液中氧的消耗,其速度与溶液中的葡萄糖浓度有关。若氧电极是市售的,则酶电极很便宜,而且容易制备,这样就提供了专一测定溶液中 D-葡萄糖的一种简便方

法，特别适用于测定从不透明或含悬浮颗粒溶液中取得的样品。这种系统的发展使 Yellow Springs Instrument Co. (黄潮仪器公司) 生产出工业用分析仪。一些可制备的其他酶电极列于表 4.21 中。

表 4.21 酶 电 极

测定对象	酶	感应电极
D-葡萄糖	D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	氧电极
蔗糖	β -D-呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26) 和 D-葡萄糖氧化酶 (EC1.1.3.4)	氧电极
尿素	脲酶 (EC3.5.1.5)	阳离子或二氧化碳电极
乳酸	乳酸脱氢酶 (EC1.1.1.27)	白金电极
乙醇	醇脱氢酶 (EC1.1.1.1)	白金电极
D-氨基酸	D-氨基酸氧化酶 (EC1.4.3.3)	阳离子电极
胆固醇	胆固醇氧化酶 (EC1.1.3.6)	氧电极
青霉素	青霉素酶 (EC3.5.2.6)	pH 电极
苦杏仁苷	β -D-葡萄糖苷 (EC3.2.1.21)	氧电极
L-苯丙氨酸	L-氨基酸氧化酶 (EC1.4.3.2) L-氨基酸氧化酶 (EC1.4.3.2) 过氧化物酶 (EC1.11.1.7)	铵离子电极 碘电极
单胺	胺氧化酶(含铜) (EC1.4.3.4)	氧电极
谷氨酰胺	谷氨酰胺酶 (EC3.5.1.2)	阳离子电极

4.6.1.2 自动分析

固定化酶在自动分析上的应用一般有两个方面，即大批小样品(如血样)的常规分析和大体积样品物流的连续监测。不采用将一定量的可溶酶加到每个样品中的办法，而是把酶固定化，然后将其固着在样品流中进行测定。使用固定化酶柱是不切合实际的，因为它会产生对液体流动的阻抗，将酶固定在中空细管的内壁上，检测前，样品先通过这些管，例如像“自动分析器 (Auto Analyser®)” 系统那样，提供了一种简便

的常规连续流动分析手段。把含有不同酶的许多固定化酶管连接到一起,可对一个样品进行多项分析。Sundaram (1979)发明了一种适用分析样品数目较少的简单系统。这个系统使用一种固定化酶移液管,酶固定在与可调移液管连接的尼龙管的内壁上。例如,用于测定血清中的尿素,将样品吸入移液管(称为 Impette),保持一定时间后,然后排出,并测定反应产物(这种情况下产物为氨)。

若要对大体积的材料进行连续分析,可以采用 Mosbach 和 Danielsson (1974) 介绍的另一种方法。其原理是用放在固定化酶柱中间的热敏电阻检测和定量底物溶液通过柱进行酶反应所产生的热。这个系统的主要优点是检测系统并不靠光学测定,因而可适用于不透明的液流。

4.6.2 治疗上的应用

在生物医学领域中的应用仍处于基础研究阶段,这是因为还缺乏必要的有关毒物学、溶血作用、过敏性、免疫反应及系统在体内的化学稳定性等方面的资料。有前景的应用集中在两个主要方面,即酶补换和酶治疗。

4.6.2.1 酶补换

有许多种疾病是由于遗传机能失常,或因组织器官机能失常导致的特种酶的缺失引起的,从而使某些产物积聚,产生严重后果。从理论上讲,这样的疾病是可以控制的,比如注射由微生物产生的可溶酶;若以固定化形式给酶,可避免引起免疫反应;或者采用体外支路除去积累的有害物,以净化血液。

4.6.2.2 酶治疗

酶治疗不同于酶补换,因为加入体内的酶通常是体内并

不存在的,或者其酶量不因病理状态而有所减少。这样一些酶加入体内,可改变体内的正常环境,以控制病状。例如,使用 L-天冬酰胺酶 (EC 3.5.1.1) 从血液中除去 L-天冬氨酸以治疗某些白血病。酶是以生物可降解的固定化形式进入体内的,如以聚乳酸胶囊形式给药。

4.6.3 工业应用

目前在工业上应用的主要是水解酶类,因为这些酶一般比较稳定又不需要辅酶。应用的主要领域是食品和制药工业,其他可能的应用有废弃物处理和精细化学产品的生产。目前只有三种工艺过程以工业规模进行生产:

(a) 在日本用固定化氨基环化酶 (EC3.5.1.14) 光学拆分乙酰基-DL-氨基酸生产 L-氨基酸。

(b) 在欧洲、日本和美国用 D-葡萄糖异构酶 (EC 5.3.1.5) 生产高果糖浆。

(c) 在欧洲、日本和美国用固定化青霉素酰化酶 (EC 3.5.1.11) 生产 6-氨基青霉烷酸 (6-APA)。

与大量发表的研究报告相比,固定化酶在工业上的应用是有限的。这有几个原因,主要是经济方面的原因,固定化使用的试剂和载体成本太高。其他原因有固定化效率低,工作稳定性差,连续操作使用的设备比较复杂,产品的需求量低而不适于大规模生产。今后固定化酶技术的发展一方面必须进一步考虑发展不同的更为复杂的工艺过程,另一方面必须探索解决经济和技术问题的途径。

4.6.4 未来趋势

第一个人工固定化酶虽然是大约 65 年前报道的,但是到 60 年代末,工业界和科学界对固定化酶技术的广泛应用才迈

出了一大步。如上所述,目前这种技术的应用还是很有限的。

固定化酶技术应用的一个未来领域,或许是需要多相环境和(或)辅因子再生的多酶固定化体系的新反应器开发。目前适于工业应用的这种反应器还没有出现。这些应用包括用固定化酶和辅因子系统生产现在用发酵法得到的材料,以及合成新的有用的产品;用固定化酶技术处理食品制造工业的废水和排出物。由于能源成本提高,希望能有代用能源,人们预料通过化学能转化用太阳光发电的生物化学燃料电池将会发展。

近年来,固定化酶技术的重要进展之一,是开发活微生物细胞的固定化(Kennedy, 1978)。这一发展可以给固定化酶所固有的许多经济问题找到解决办法,例如,可避开相当量酶的分离、提取和纯化,并能最大限度减少酶的损失。因为它们能够增殖,因此可作为一种固定化酶的自动自我更新的形式。细胞的固定化意味着不必预先提纯酶就可以在非常相似于酶存在的天然环境条件下使用,而且包含了所有的必需辅因子等。有关固定化微生物细胞的综述可参阅 Kennedy 和 Cabral (1983) 的综述。

第 5 章 临床分析用酶——原理

B. T. 古尔德 B. F. 洛克斯

5.1 引 言

在《酶生物技术手册》(Gould, 1975; Barket Kay, 1975) 第一版的两章中只简要地谈了本章的论题。在临床分析中, 纯酶最常用于测定血浆或血清中底物的浓度(见 5.2)。从本书前一版到现在所取得的主要进展是在平衡测定发展的同时, 酶动力学测定得到稳步发展。很多酶的测定是比较困难的, 但在某些特定条件下加入一些其他酶, 可以简化这些酶的测定。这类分析需要加入较大量的纯酶(见 5.3)。对于大多数分析来说, 采用纯酶可能是昂贵的, 这也是采用可反复使用的固定化酶进行临床分析日趋增多的主要原因之一(见 5.4)。酶在临床分析中的另一种重要应用是酶的免疫测定(见 5.5)。在过去 5 年中, 此类测定法的商品化数量迅速增加。开始, 这类方法主要用来测定血或尿中各类药物的浓度, 现在人们认识到这类方法还有很多潜在的使用价值。

酶用在临床分析的原因主要是由它的两种众所周知的特性所决定的, 即催化的效率和专一性。由于酶是极佳的催化剂, 所以即使在十分温和的温度、pH 条件下, 酶促反应也会十分迅速地进行, 并且不影响反应的平衡点。酶的专一性可使特定反应的速度或者使受局限的相关反应的速度加快。这样就可达到迅速测定存在于某些复杂介质(如血清、血浆和

尿)中的某种特定化合物,而不必先经纯化。酶免疫测定的关键特性,即专一性来自抗原-抗体间的专一性结合,而酶提供了常可对信号放大的容易检测的标记。

图 5.1 所示是一个典型的酶促反应进程曲线。这个曲线由两部分组成,并由此两部分得到数据。仅用于测定底物浓度的平衡法用的是在产物或底物浓度不依赖于时间的条件下收集到的数据,而浓度依赖于时间的条件下获得数据的方法为动力学测定法。后一类方法中,通常在曲线初始的直线部分收集数据,该部分被称为初速度。

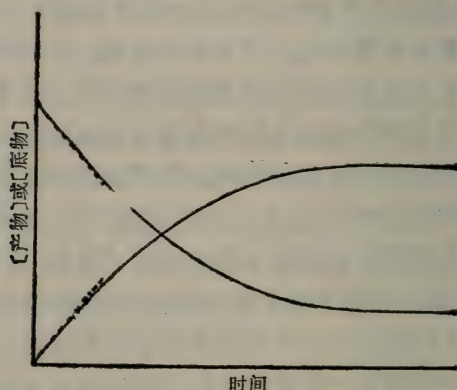
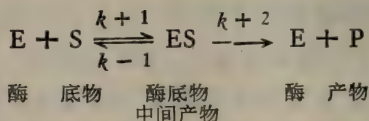


图 5.1 典型的酶促反应进程曲线。根据底物的减少或产物的形成来对反应进行跟踪测定。在时间为 0 时,反应曲线(.....)的正切值即为初速度,当反应达到平衡时,反应进程曲线有一个恒态值。

最简单的酶促反应包括一种底物和一种产物。



Michaelis-Menten 方程式是描述反应速度依赖于底物浓度的一种方法

$$r = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$$

这里， r = 反应速度， $V = (k_{+2}[E_0])$ 是反应的最大速度， $[S]$ 和 $[E_0]$ 是初始底物浓度和初始酶浓度， K_m 是底物的 Michaelis 常数， k_{+1} ， k_{-1} ， k_{+2} 是反应速度常数。

由此方程可以绘制出如图 5.2 所示的矩形双曲线。不同的底物浓度适用于不同的目的。如果用动力学方法测定底物的浓度，那么底物的浓度应该是限速 (rate-limiting) 的，所以底物的浓度不应高过酶的 K_m 值太多。当欲测定血清中某种酶的活性时，酶应该是限速的，那么就得使用高浓度底物。

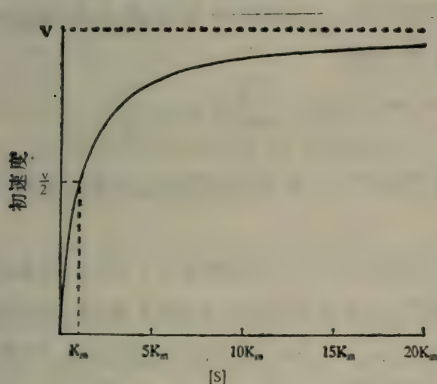


图 5.2 理论 Michaelis 作图。

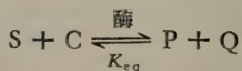
酶促反应的速度几乎完全依赖于 pH 和温度，因此在一切动力学方法中，应严格控制这两种因素。很多化合物可以降低(抑制剂)或增加(激活剂)酶催化的反应速度，这些化合物的存在会影响动力学方法的准确性。

5.2 底物浓度的酶法测定

很多底物或代谢物可以借助于酶进行测定。在此节中提到的某些辅酶,如 ATP、氧化型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)或还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸($\text{NADH} + \text{H}^+$)也可看作为底物。最常测定的底物是尿素和葡萄糖,但在临床化验室中,还对其他几种底物进行测定。如要对这类分析有全面深入的理解,请借鉴 Bergmeyer (1974) 的 4 卷专著或后来从 1983 起连续出版的 10 卷专著。

5.2.1 平衡法原理

该测定法很简单,但需要考虑平衡点和达到平衡点所需要的时间。请看方程:



式中 S 代表待测底物, C 是辅酶或辅反应物, P 和 Q 是酶催化反应的产物。

测定时利用掉的底物的比例越高,测定结果越精确。该比例是由初始 C (C_0) 量相对于 S (S_0) 的量和反应的平衡常数 (K_{eq}) 决定的。表 5.1 所示的是要达到 99%、99.5%、99.9% 的转化率计算出来的 $C_0 : S_0$ 。平衡常数增加所需要的相对来说过量的辅反应物量就减少。在低 K_{eq} 值时要求非常高的比率,看来在实际使用中会发生困难。例如,辅反应物的不溶性,以及可能对酶造成抑制,或者增加起始本底吸光率。如果反应没有达到完全,需绘制所设定的底物浓度范围的校正曲线。这样做还可以消除校正曲线的非线性,这种非线性曲线在低 K_{eq} 值时是十分明显的 (Carr 和 Bowers,

1980)。另一种解决办法是改变平衡点,有时可以通过改变反应的 pH 或加入一种可以同产物之一结合的试剂而实现 (Bergmeyer, 1978)。

在测定过程中,影响 K_{eq} 值的因素应保持恒定,这在低 K_{eq} 值时尤为重要。只要酶的摩尔浓度明显低于 S_0 ,那么酶的存在就不会影响 K_{eq} 值。 K_{eq} 值受温度和 pH 的影响,因此测定过程中应控制这两个参数。

表 5.1 需达到所述百分转化率的初始 [辅反应物]:
初始 [底物] 计算出的比率

转化	$C_0 : S_0$ 值			
	K_{eq}			
	1	5	10	50
99%	100	20	10	3
99.5%	200	40	20	5
99.9%	1000	200	100	20

酶促反应达到平衡所需要的时间可以由 Michaelis-Menten 方程积分形式计算出来。

$$t = \frac{2.3K_m}{V} \lg \frac{S_0}{S_t} + \frac{(S_0 - S_t)}{V}$$

V 和 K_m 的含义与前面相同, t 是反应时间, S_0 是底物初始浓度, S_t 是 t 时间后底物浓度, $(S_0 - S_t)$ 是时间 t 后产物浓度。

如果我们采用底物到产物的 99% 转化率作为合适的估计值,那么 $\lg \frac{S_0}{S_t} \cong 2$, 并且以 S_0 为基准, S_t 可以忽略不计,从而上式变成

$$t = 2.3 \times 2 \frac{K_m}{V} + \frac{S_0}{V}$$

如果 $S_0 \gg K_m$, 那么 S_0/V 的最大值即为 K_m/V

$$t \cong 5.6 \frac{K_m}{V}$$

如果反应在 5 分钟内完成, 其 K_m/V 应稍大于 1 min/ml; 如果 $K_m = 10^{-3} \text{mol/L}$ ($1 \mu\text{mol/ml}$), $V = 1 \text{U 酶/ml}$, 酶的国际单位 U 为每分钟将一微摩尔底物转化成产物所需要的酶量, 所以

$$\frac{K_m}{V} = \frac{1 \mu\text{mol/ml}}{1 \mu\text{mol/min}} = 1 \text{min/mol}$$

如果与 E_0 成比例的 K_m 和 V 是已知的, 就可根据此公式算出每毫升反应混合物所需的酶量。

在此计算公式中, 忽略不计可改变测定时间的某些因素。如果反应生成的产物会引起产物抑制, 或明显加速逆反应, V 会下降。如果如以上所假定的 $S_0 \gg K_m$, 那么这种可能性通常是不重要的。如果 $S_0 > K_m$, 那么将会使反应时间明显增加, 同样也会由产物形成所造成的潜在问题加重。生物样品中的激活剂存在将减少 K_m/V , 由此也会减少完成反应所需要的时间, 相反, 抑制剂的存在会增加 K_m/V , 并且会增加达到平衡所需要的时间。

图 5.1 代表的是典型的反应进程曲线。但在实际工作中往往会得到这样的曲线: 底物迅速消耗以后, 曲线有线性偏移(见图 5.3a)。最可能的原因是一种不纯的非专一性酶仍在持续催化一种慢反应。如果存在线性偏移, 可由外推法使之至时间为零来进行校正。如果采用纯的专一性酶, 就可避免这类问题。图 5.3(b) 所示的是一条类似的曲线, 但在加入酶以前已有反应。这是由所存在的内源酶和辅反应物所造成的, 可以通过加酶以前进行长时间(例如 20 分)的预保温来克服这样的问题。图 5.3(c) 给出了另一类型曲线, 在反应过程

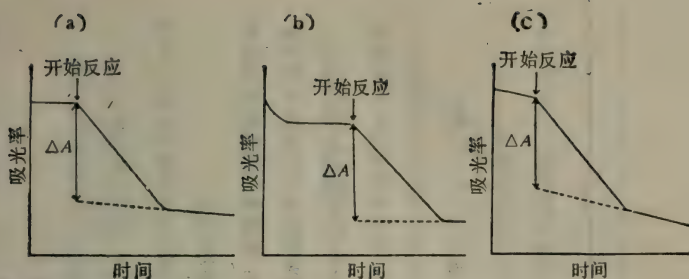


图 5.3 典型的反应进程曲线和校正方法

(a) 图示反应完成后持续存在慢反应。加入专一性的酶开始反应时,用外推法使时间为零进行校正(↓)。(b) 在开始所需要的反应之前进行预保温是必需的,以使内源反应进行完全。(c) 在反应开始前,用外推法可使时间为零的连续副反应得以校正。

中持续存在一种副反应,例如还原型 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 在呼吸链酶的存在下被溶解氧氧化。在这种情况下,除非可以抑制副反应,否则应该用外推法到时间为零来进行校正。图 5.3 所见的各种问题都可得到解决。但这些解决办法要依赖于几个时间点上收集到的数据,而这往往会增加每次测定的操作时间。

5.2.2 动力学测定法原理

60 年代早期,日益增加的临床生化检验的工作量通过引进连续流动分析仪而得到部分解决。分析数目增加的部分原因与测定几种酶活性有关。开始是使用单时间点测定,人们认识到这种方法的局限性后,自然就采用跟踪反应进程曲线早期线性部分来测定初速度(图 5.1)。此方法是一个较慢的过程,但从 60 年代初以来,由于引进了各种连续动力学分析仪,这个问题得到了解决(Purdue, 1977)。这些仪器一般是若干固定的时间间隔对反应的进程进行跟踪,检验曲线的线

表 5.2 用于底物测定的平衡法和动力学法的比较

	平 衡 法		动 力 学 法	
	评价*	说 明	评 价	说 明
跟踪吸光度的变化	+++	较大,并且测定准确,更敏感	++	很小,但在高级动力学分析仪认
pH 变化	++	可能会改变 K_{eq} ,但除非 K_{eq} 较低,否则不会引起偏差	-	别范围内,电噪声可能会引起偏差 任何偏离最适 pH 的变化都可能引起低值,特别是在测定时使用两种以上的酶时值更低
温度变化	+++	会改变 K_{eq} ,但除非 K_{eq} 较小,而且温度改变几度,否则不会引起较大的偏差	+	需要良好的温度控制($\pm 0.1\%$)
抑制剂的存在	++	延长反应时间,反应结束延迟	+	低值
激活剂的存在	+++	反应达到平衡快得多	-	高值

K_m 的影响	++	低 K_m 值减少测定所需时间		K_m 值越高,可能测出的 S_0 越高
最大 S_0	++	$S_0 < K_m$	++	$S_0 < K_m$
与 S_0 呈线性	++	线性的,但低 K_{eq} 会有偏差		非线性的,所以需要校正曲线
K_{eq}	+	低 K_{eq} 会出现溶解性、抑制性和本底吸光度等问题	+	低 K_{eq} 测定非常灵敏
所需测定时间	+	几分钟	+++	一般 < 1 分钟
酶费用	-	在适当的时间内完成测定,费用相当高	++	较低,需足够量的酶以给出信号和噪声的合适比率
辅因子费用	-	在适当的时间内完成测定,费用相当高	++	较低,但其浓度不能成为限速因素
产物形成	++	可能会引起反应的抑制或逆转	+++	太少而不致对反应产生影响
不稳定产物	+	不能检测产物	++	如果快速测定,不成问题
混浊或有颜色的样品	+	需空白对照	+++	对反应速度应无影响
仪器设备	+++	不需要高级精密仪器,但需生产专用仪器	+	需要高级精密仪器,但可用于其他分析

* “+” 有条件的程度,“-” 不利条件(译者)。

性部分,并打印出初速度。由于这些高级的动力学分析仪器可取任意时间,因此促进了底物的动力学测定法的发展。

Michaelis 作图(图 5.2)指明初速度是底物浓度的非线性函数。当 $S_0 > K_m$ 时,此方法的灵敏度随着底物浓度的增加而明显下降,因此 $S_0 = K_m$ 是应用动力学方法的上限。尽管所用的底物浓度低于 K_m/Z_0 时,线性部分的理论偏差 $< 3.3\%$,但仍需绘制整个底物浓度范围的校正曲线,从而解决了非线性偏差。

应用动力学方法时,反应速度的测定是迅速的。但是这样做的直接结果是:所测定参数(通常为吸光率)的变化非常小。基于这样的原因,电子噪声可能是重要的误差源,但这个问题可用增加测定体系的酶量得到部分解决。

影响初速度的任何因素都将影响动力学方法的准确性。生物样品中存在的酶激活剂或抑制剂是很难检测出的,而这些因素会显著改变动力学测定的结果。精确的测定要求温度控制在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。控制 pH 也很重要,在测定系统中所用的酶超过一种以上,并有不同的最适 pH 时,则更应控制 pH。

5.2.3 平衡法和动力学法的比较

表 5.2 介绍了平衡法和动力学法的一些特点。人们一般都愿使用平衡法。它的主要缺点是:所用的酶和辅酶都很昂贵,而且每次测定的时间较长,而精密复杂的动力学分析仪正好在这一点上显出优越性。但是,如果在生物材料中存在酶激活剂或酶抑制剂,而且又不能将其检测出来,那么动力学方法易于产生很大的偏差。与测定中的正常底物浓度有关的 K_m ,在决定采用哪一种方法测定更为合适上可能是很重要的。

最近,已尝试把动力学法的应用范围扩大到远大于 K_m

的底物浓度的测定。一种方法是在测定时加入竞争性抑制剂使 K_m 明显增加 (Samposon 和 Baid, 1979); 另一种方法较通用 (Hamilton 和 Pardue, 1982), 即采用非线性回归分析法使吸光率 (A) 和速率 (dA/dt) 对时间的数值适合于 Michaelis-Menten 方程式。从而给出底物浓度远低于 K_m 到 $3.5K_m$ 的线性校正作图。

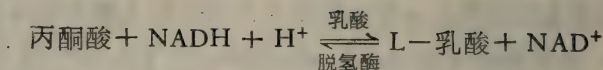
5.2.4 常规临床分析中常用的指示剂种类

常规临床分析中进行测定的化合物数目有限。下面介绍这些指示剂种类以及使这些指示剂适用于灵敏、专一及多样的临床分析特性。更详细的讨论见 Carr 和 Bowers (1980) 的文章。

5.2.4.1 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸

尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸以氧化型 (NAD^+) 和还原型 ($NADH$) 的形式存在。尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸也有两种存在形式, 即 $NADP^+$ 和 $NADPH$ 。图 5.4 表示它们的结构和相互转化。 $NADH$ 在 339 nm 波长时, 光吸收最强 ($\epsilon = 6.31 \times 10^3 \text{ L/mol} \cdot \text{cm}$), 而氧化型没有吸收。 $NADP^+$ 和 $NADPH$ 同 NAD^+ 和 $NADH$ 的特性十分类似。表 5.3 列出 $NADH$ 在特定波长的摩尔吸光率, 并且指明随着 pH、温度和离子强度的变化, 其吸光率是如何作轻微变化的。随着温度的变化, 其最大光吸收波长同样也会发生微小变化。实际得到的测定值当然是依赖于所用分光光度计的类型, 尤其是依赖单色光镜的带宽。

这些化合物所参与的一个简单反应是用乳酸脱氢酶测定丙酮酸。



一般在 340 nm 波长条件下测吸光率来跟踪 NADH 的减少量。由于 pH7.0 时 $K_{\text{eq}} = 2 \times 10^4$, 所以只要 NADH > 丙酮酸, 反应就会进行到底。用 Bouguer-Lambert-Beer 定律, 总吸光率的变化可与丙酮酸初始量相关 ($A = \epsilon \times C \times l$), 这里 A = 吸光度, C = 浓度 (mol/L), l = 光径长度 (cm), ϵ = 摩尔吸光系数 (L/mol · cm)。

同样的酶催化反应也可用来测定乳酸, 但进行这样测定的反应是逆方向的, 反应在 pH 9—10 的缓冲液中进行, 以中和反应过程中释放出的 H^+ 。反应中生成的丙酮酸可用胍截留, 或者用另一种酶——丙氨酸转氨酶进行酶法去除。在这

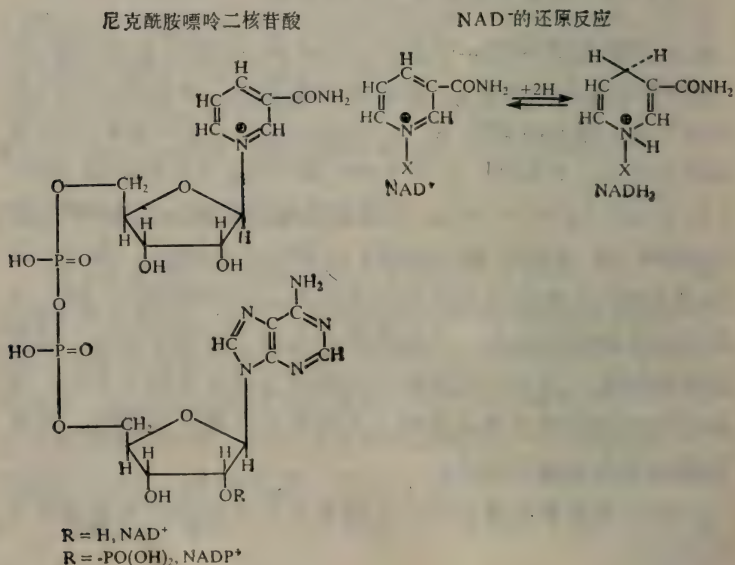


图 5.4 NAD(P)⁺ 的结构及其氧化还原反应。

两种情况下,反应均有利于利用乳酸,并要有等当量数的 NAD^+ 。另外,有必要校核一下改变成高 pH 以及存在其他化合物的条件下,酶是否能催化功能。

在丙酮酸-乳酸的反应中, NAD^+ 和 NADH 是两种反应物,所以利用此反应可直接测出这两种化合物。有许多物质不可能进行这样的测定,但是采用两种或更多种偶联酶的酶促反应,就可产生与初始底物浓度等当量的 NADH 或 NADPH 的变化。用己糖激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶对葡萄糖的测定可以证明这一点。

表 5.3 NADH 的摩尔消光度

波 长 (nm)	NADH , 25°C (1/mol·cm)
334	6180
339	6310
366	3500

(i) pH 由 8.8 \rightarrow 6.8,每变化一个 pH 单位,消光度减少 16。

(ii) 温度由 25°C 增加到 35°C,每变化 10°C,消光度减少 24。

(iii) 离子强度 (NaCl) 由 0 \rightarrow 1.0 mol/L,消光度减少 60。

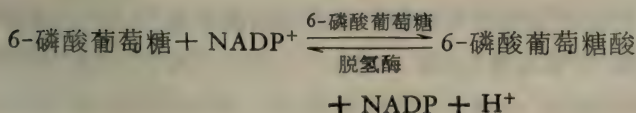
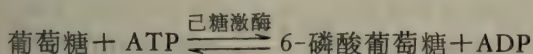
·最大吸收波长随温度的降低是:

0°C 340nm

25°C 338nm

40°C 337.5nm

参见 McComb 等 (1976), Zeigehorn, Senn 和 Bücher (1976)。

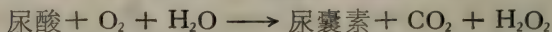
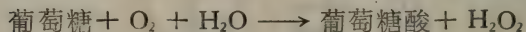


己糖激酶对己糖有广专一性，所以也会把果糖和其他自然存在的碳水化合物转化为相应的磷酸化合物，但有 NADP^+ 参加的第二种酶催化反应对 6-磷酸葡萄糖非常专一，这样就可准确专一的测定葡萄糖。这种独特的测定方法有三个缺点：第一，辅酶 NADP^+ 比 NAD^+ 还要昂贵。第二，加入两种或更多种的酶会增加分析费用。第三，如果采用动力学法，那么由两种酶参加的测定初始阶段常会有延缓期，因此在测定时就需稍作延缓。

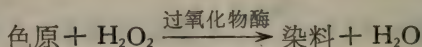
测定 NADH 或 NADPH 的另一种方法是加入氧化剂同 NADH 或 NADPH 反应，从而重新形成 NAD^+ 或 NADP^+ 。加入四氮唑蓝盐后，会产生具有强烈吸光的有色的甲臜。化学反应比较缓慢，因而通常要加入一种酶，如心肌黄酶，以加速反应。这种 NAD(P)H 清除法提供了另一条使反应平衡常数有效改变的方法 (Möllering, Wahlefeld 和 Michal, 1978)。

5.2.4.2 氧和过氧化氢

临床化验室中进行酶促测定是以三种较常见的方式出现的，即利用氧并生成过氧化氢：

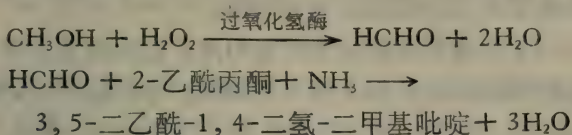


通常采用灵敏的比色法，利用过氧化物酶测定过氧化氢。



目前用的色原为邻联(二)茴香胺或连氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸盐)二胺。此外，可利用两种化合物的氧化偶联，包括酚同 4-氨基非那宗或者同 4-氨基安替比林，或用另

一种偶联法，即同 N-乙基-N-3 (3-羟乙基) 间甲苯胺以及同 2-脲-2, 3-二氢-3-甲基-磺基苯并噻唑的偶联 (Carr 和 Bowers, 1980)。另一反应系统是采用过氧化氢酶。



过氧化物酶法易受许多化合物的干扰，如抗坏血酸、尿酸、谷胱甘肽、乙酰水杨酸。所有这些化合物都会降低测得值；相反，过氧化物的存在会提高所得值。加入过量很多 (> 200 倍) 的试剂稀释血浆样品，可减少这些化合物对测定的干扰。

测定三种反应中的其他共同组分的一种，可减少可能产生的干扰并降低第二种酶的费用。如可用氧电极测定反应中利用的氧 (Koch 和 Nipper, 1977)。如果所有的组成化合物都以溶解状态存在，就可采用此方法。而引入固定化酶(如葡萄糖氧化酶)后，形成了适用于常规分析的更经济的半自动化方法。最近，一种采用固定化氧化酶的 H_2O_2 -敏感电极已经投入了常规使用。有关这些电极的详情可参见 5.4.2。

B 部分表 5.1 列出了临床化验室中以酶作分析工具所测定的一些化合物(底物)。

5.3 酶的测定

测定体液中的酶类有助于诊断或用于监测临床治疗效果。这类测定法的原理是：某种酶只存在或主要存在于某种组织。另外，已经知道某酶有多种存在形式(如同工酶)，每一种同工酶都有其不同的组织分布。当某些特定的组织因病受到损伤时，血清中这些酶的含量就会增加。

酶测定的更专门的应用是检测某种酶是否有缺失,一般来讲,如果有缺失,就检测不到某种酶的活性,或只有一点活性。要进行这种检测,通常需要取得组织样品。这类测定方法用来确定先天性代谢缺陷的病因。

动力学法测定酶同前面介绍的测定底物的方法相类似,所不同的是限速的是酶,而不是底物。也在尝试用免疫测定(Iandon 等, 1977)或活性部位滴定(Roth 和 Selz, 1980)来测定酶量,但至今常规操作中尚未用上这两种方法。

5.3.1 偶联酶法测定酶的原理

酶可用试剂盒形式购得(只有一种例外),其中包括作为分析工具的其他一些酶,而且都利用 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ 为终点。这种类型测定所需要的成分及条件见表 5.4(Gould, 1978)。

表 5.4 用偶联酶作酶法测定的成分及条件

酶样品(例如血清)	—限速(rate limiting)
	—典型的 $A_{340} = 0.7-4.6$ (血清)
辅酶/辅底物	—最适浓度
偶联的酶	— $\text{NAD(P)H} > 0.2\text{mmol/L}$
$\text{NAD(P}^+)/\text{NADPH}$	— > 40 倍过量
缓冲液	— pK 值接近于酶的最适 pH
温度(例如 25°C , 30°C , 35°C , 37°C)	—控制在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$
专一底物	—用加入最适浓度的专一底物以开始反应
混合,在 340nm 波长跟踪 NAD^+/NADH 的转化	

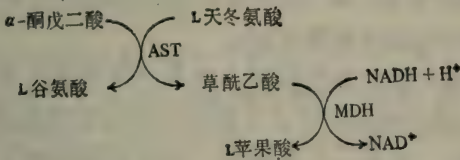
血清中含有多种蛋白质,其中有些是酶,但进行测定的只是其中之一。在反应管中此酶的活性必须是限速的。如果测定的是血清酶,就要把血清稀释成 1:10 到 1:30。这种稀释也会减少血清在 340nm 波长的吸光率。

大部分酶都有两种底物，而且都以最佳浓度加入。在实际测定时，底物的浓度受底物的溶解度和高 S_0 可能出现的对反应抑制的限制 (Bergmeyer, 1978)。如果能达到 $S_0 = 19 \times K_m$ ，那么 Michealis-Menten 方程 (5.1) 将变成：

$$v = 0.95V$$

即初速度 v 是最大反应速度的 95%。因为方程给出了矩形曲线 (见图 5.2)，那么在此水平 S_0 的少许变化，伴随的 v 的变化甚微。因此，只要在 10% 的底物转变成产物之前测定反应速度，那么在此浓度条件下测定的结果将是一致的。但应保证任何逆反应或产物的抑制所致的偏差是微不足道的。由于血清中存在其他的一些酶，所以经常存在第二种反应，而上述的底物浓度也足以供给第二种反应所要消耗掉的那份底物。应给与时间使这些血清中内源底物耗尽而出现的第二反应得以完成，这是通过在真正的酶测定开始之前加入对第二酶反应较专一的底物并保温来达到的。

天冬氨酸转氨酶 (AST) 是用偶联酶进行测定的第一个酶，这里用的偶联酶是苹果酸脱氢酶 (MDH)。



如果要使 NADH 转变成 NAD^+ 的测定速度成为测定 AST 的精确方法，就必须使第一步反应生成的草酰乙酸刚生成立即就被 MDH 催化的反应所利用。这样，MDH 催化的反应不得不在不利的条件下进行，MDH 的一种底物的浓度实际上几乎接近于零。为满足这一条件，偶联酶的总活性至少是待测酶总活性的 40 倍 (Bergmeyer, 1978)。即使这样，当草

酰乙酸的浓度增加到低稳态水平时,也会存在一个停滞期。应该在底物耗尽所导致的反应明显偏离真实的反应速度到来之前,完成停滞期和对反应速度的测定。如果参加反应的偶联酶有一种以上,那么停滞期还会延长,所以必须增加其他酶的总活性,以此来保证测定的准确性。

进入偶联酶体系的大量的其他酶类必须是纯的,尤其是不应沾染有待测酶的活性。使用这样的纯酶势必会增加每次测定的费用。

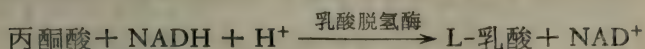
测定开始时,反应体系中的 NAD(P)H 的浓度不应超过 0.2 mmol/L 。在这样的浓度下,其 340 nm 波长的吸光率为 1.26 (光径长度为 1 cm)。这个数值加上其他光吸收样品(包括血清)的吸光率,在散射光引起较大的偏差以前就已接近上限值。

酶的测定应在最适 pH 下进行。在最适 pH ,当 pH 稍有偏离,对反应速度的影响较其他 pH 下发生偏离的要小。酶的最适 pH 依赖于温度、底物浓度,当然也应按测定所用的实际条件来决定。高浓度缓冲系统的成分通常会抑制酶的活性,如果缓冲液的 pK 值接近于测定所需要的 pH ,那么就可把缓冲液的浓度降到最低值。

一些酶不要求最适温度,推荐了使用的温度范围(见表 5.4),测定混合物的所有成分都应在所选定的温度下,这一点是很重要的。另外一个关键是,在这样的温度下或在任何预保温的过程中都不应使血清酶失活。温度每变化 1°C 会使酶的活性发生 $5\text{—}10\%$ 的变化,所以准确的测定需将温度控制在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 之内。

反应开始前,需对参与反应的所有成分(除待测酶所需的专一底物外)进行保温。在这段保温时间中,血清中其他酶类的内源底物会发生反应。例如在测定天冬氨酸转氨酶(AST)

时,血清中存在的丙酮酸会被血清中的乳酸脱氢酶(LDH)去除。



在上述反应完成以前,不应开始AST的测定。由于一些血清样品中的丙酮酸含量相当高,所以有人(IFCC, 1977)提议在测定系统中按常规加入纯的乳酸脱氢酶,从而加速丙酮酸的去除。

B部分5.3介绍了临床化验室采用偶联酶系统测定的一些酶类(见表5.2)。

5.4 固定化酶测定底物浓度

在过去的十年里,在酶的分析领域中,人们十分注意用固定化的相应酶替代可溶酶。这是由于在常规操作条件下,某些酶的稳定性有限,而且很多分析用酶相当昂贵。固定化酶的开发利用为临床化学家提供了具有可重用、稳定性更佳、可靠性更好等优点的测定方法。

在有关的文献中,有500多篇论文介绍了利用固定化酶进行分析的方法。并且其中有许多系统已用专著(Carr和Bowers, 1980; Bergmeyer, 1978; Guilbault, 1976)或综述(Free, 1977; Gray, Keyes和Watson, 1977; Ngo, 1980; Bowers, 1982; Mottola, 1983)的形式进行归纳和介绍。但是这些方法中只有很少数用于商品化生产,而且还没有发挥固定化酶在临床化学中的全部潜力。

固定化酶在临床化学上成功的应用可以分成三种类型:酶反应管、生物分析探针、干试剂产物。B部分5.3归纳了这些方法的应用。下面较全面地介绍其原理。

5.4.1 固定化酶反应管

把固定化酶纳入自动分析系统的早期工作,采用了填充床反应器。这是用凝胶或支持酶很细的分散的固体填充入柱而制成的 (Carr 和 Bowers, 1980)。这类填充床反应器有产生高压降的缺点,而这样的缺点会限制流速,从而导致分析时间延长。

将酶固定于较大的圆珠 (20—35 目,聚氨苯乙烯)上,可以克服这一缺点,圆珠填充入自动分析仪的混和螺旋管中,从而可纳入以无间隔流动分析为基础的系统。圆珠的大小和疏水性可确保快流速和良好冲洗特性 (Rocks, 1973; Miller, Rocks 和 Thorburn Burns, 1976, 1977)。

Hornby 及其合作者 (Sundaram 和 Hornby, 1970; Filippusson, Hornby 和 McDonald, 1972; Hornby, Inman 和 McDonald, 1972) 创建了第一个开放管式非均相酶反应器 (OTHERS), 把酶共价结合到狭管的内表面。OTHERS 的优点是,反应管可以十分方便的同应用广泛的气体间隔的续流系统联用,而不必对现有的一套方法进行大改动。现在一些生产厂商已出售 OTHERS (见 B 部分表 5.3),这有助于一些常规检测的代谢物的测试。有些文献已经对许多此类分析系统进行了评价。这包括对葡萄糖 (Leon 等, 1977; Chirillo 等, 1979; Werner 等, 1979)、尿素 (Collis 和 Knox, 1978; Chirillo 等, 1979; Werner 等, 1979) 及尿酸 (Chirillo 等, 1979; Werner 等, 1979; Leon 等, 1982) 的测定。

典型的制备法是取内径为 1mm 的尼龙管,以各种方法在内表面涂以一种或多种酶 (Sundaram 和 Hornby, 1970; Horvath 和 Solomon, 1972; Hornby 和 Morris, 1975) (见

B部分第5章)。OTHERS 的操作和贮存稳定性因加入的酶和将酶涂在内表面所用的方法而异。固定化葡萄糖氧化酶制剂一般要比固定脲酶和尿酸酶的制剂更稳定。当反应管充满缓冲液在 4℃ 条件下贮存,其典型的货架寿命为 1—18 个月。而在干燥条件下贮存,酶活性丧失较快。经 1000—30000 次测定,酶活性不会有明显降低。有报道表明,间断地使用单管 3 个月后,还可用于进行有效的分析 (Chirillo 等, 1979)。但是,反应管必须避开过高或过低的 pH、重金属和其他酶的“毒物”,如氰化物或叠氮溶液。在缓冲液中加入抗微生物试剂会延长反应管的寿命 (Leon 等, 1977)。

OTHERS 的主要优点是可重复使用。这个优点可以减少由酶溶液的制备和处理而带来的问题。同一些厂商的广告文献所宣传的相反,采用 OTHERS 同采用可溶性酶相比,并不一定节省费用。例如,采用自动分析仪 II 的葡萄糖测定法中,用市售固定化酶替代可溶性己糖激酶,从其经济效益的研究可以看出,每天至少处理 140 个样品,才能显示这种替代在经济上的优越性。如果每天只处理 50 个样品,使用固定化酶管的费用将是用游离酶的费用的一倍。另一方面,如果酶反应管每天处理 200 个样品,其费用将比使用可溶性酶节省 30%。这个计算是以己糖激酶反应管的有效期为一个月为标准的 (Technicon 出版, 1981 年 7 月)。

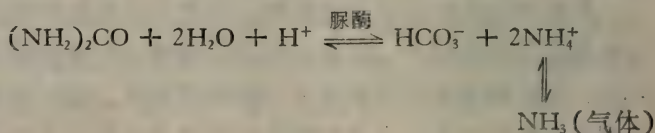
开始的设计是为了使这些酶反应器可以同能测定产物的比色测定系统相联用,但是也可同其他适当的检测量器对接联用。如果酶促反应中有电活性底物或产物,就可用电化学监测仪器取代比色计,这时的分析系统也就变成了无试剂系统。因为此时反应所需要的仅是缓冲液 (Campell 和 Hornby, 1977)。另一种办法是将固定化酶同转换器联成完整的单位,从而制出生物分析探针,也称酶电极。

5.4.2 生物分析探针

实际上生物分析探针(酶电极)是由任一种电化学传感器同一层用于测定某种底物浓度的固定化酶层相结合而形成的联合体。酶层的外表面同待测溶液相接触,通常用搅拌以减小分析溶液的浓度。底物扩散到酶层并转变成可被转换器检测的电活性化合物,无论在反应的稳态或初始阶段都可由转换器进行测定。反应初阶段测试技术可快速读数,但对温度敏感。参照参比电极,可以测定出电极的电位或电流。由此可以推算出底物的浓度,底物的浓度同电位差计电极的关系是对数关系,而同电流计电极的关系是线性关系。

为增加专一性,减少干扰物质的影响,有时要在固定化酶和溶液之间,有时还要在酶和转换器之间放一半透膜。

大量的文献报道了测定尿素、葡萄糖、乳酸、乙醇、青霉素、胆固醇、氨基酸及很多其他物质的生化传感器(参考 Moody 和 Thomas, 1975; Carr 和 Bowers, 1980 的综述)。遗憾的是其中很多传感器在实际应用中受到严重的限制,尤其是很难用于生理体液。这常常是由于转换器的选择性较差所致。例如,分析尿素的几种方法都要采用氨离子敏感电极。电极由固定化脲酶所包绕,扩散到电极的尿素分子被脲酶水解:



反应产物中的一种是 NH_4^+ , 它可被电极感应,但是氨离子转换器对单价阳离子(包括 H^+) 都感应。尽管电极对氨离子的敏感性高于对 Na^+ 或 K^+ 的敏感性,但是血浆中这些

离子的存在会严重干扰尿素的测定。采用氨气敏感电极可以消除这类干扰离子引起的特殊问题。这类传感器中,酶层同玻璃 pH 电极之间由一气体通透膜隔开。在碱性缓冲液中,脲酶分解尿素所释放出的气体氨扩散过膜,并激活 pH 传感器。但这个方法还存在局限性,即氨气电极起作用的最适 pH 并不是选作脲酶的最高活性的 pH。此外,氨气电极还有感应很缓慢并且不易洗涤的缺点。

Yellow Springs Instrument Co. (Y. S. 仪器公司)生产的葡萄糖分析仪似乎是唯一采用酶电极的商品化仪器 (Chua 和 Tán, 1978; Spencer 和 Nelson, 1978), 其葡萄糖探针 (图 5.5) 中含有一薄层固定于戊二醛树脂颗粒上的葡萄糖氧化酶。该层夹于两层膜之间, 其中一层膜被置于同过氧化氢敏感电极 (即在 0.7V 条件下极化的铂金电极, 它作为电化学槽的阳极) 相接触的位置。用一专用的具刻度的微量注射器将样品注入一个含有葡萄糖探针的缓冲试剂室内, 在固定化葡萄糖氧化酶作用下, 将从溶液扩散到电极的葡萄糖转变成葡萄糖酸和过氧化氢, 然后在电极上测定由过氧化氢产生的电流。该仪器的成功点在于膜的性质, 这些膜不但使电极含有固定化酶颗粒, 而且还可减少扩散到电极上的干扰物质的量。外膜是一种多聚碳酸酯类材料, 它具有足够使葡萄糖、 O_2 和其他小分子物质通透, 而细胞和大分子物质不能通过的筛孔。内膜是一层醋酸纤维膜, 它具有更小的筛孔 (截留分子量 100 的材料), 该膜可以隔断葡萄糖、尿酸、抗坏血酸以及大部分其他可能产生干扰的物质到达电极。但该膜可以允许某些分子如过氧化氢通过。使用这类仪器时应该注意: 某些血液防腐剂 (Hall 和 Cook, 1982; Kay 和 Taylor, 1983) 和某些药物 (lindh 等, 1982) 也可扩散到电极, 它们在电极上的氧化可以产生错误的结果。Yellow Springs 分析仪的另一特点

可以说明酶试剂的有效性;试剂溶液中含有的过氧化氢酶(可溶态)可以清除可扩散回电极的“迷途”过氧化氢,这些过氧化氢可以引起阳极电流漂移。

在我们的实验室中采用 Yellow Springs 公司的分析仪,分析任何时间(白天或夜间)送来的急诊血糖样品。该仪器还作为糖尿病门诊给非住院病人提供快速结果的一种工具。固定化酶圆盘按常规每月更换一次(一般为测定 600—700 次以后更换)。此圆盘于 4℃ 贮存,其存放寿命约为一年。

经改良后,其他一些市售葡萄糖分析仪也可使用固定化酶制剂。例如, Sokol 等人(1980)将葡萄糖氧化酶固着在衍生的聚四氟乙烯膜上,而后将此膜铺于 Beckman 葡萄糖分析仪 Clark 型氧电极的顶端。他们断言,该仪器经固定化酶改良后可得出类似于通常用于此仪器的可溶酶所得到的结果,且还具有简单、用酶经济以及在更宽浓度范围内呈直线等优点。

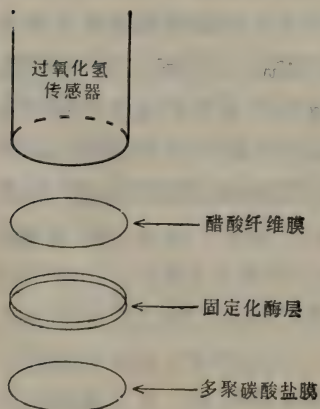


图 5.5 Yellow Springs 仪器公司葡萄糖探针剖面图。

5.4.3 干试剂化学

Free 等(1957)介绍了第一个将浸入即读值的用酶的试纸条。将酶试剂、葡萄糖氧化酶、过氧化物酶及色素原吸附到纸(纤维素)片上,就可制成这样的试纸条。将干试纸片用含有葡萄糖的溶液浸湿时,纸片便发生颜色的变化。Clinistix 试纸是由 Miles 实验室 Ames 小组开发的,并被广泛

用来检测尿糖。这种含有干试剂的纸片是被固定于一个塑料

条末端(图 5.6)。Boehringer Mannheim 出售的类似的试剂条是由一个很薄的尼龙网固定于一个塑料杆上。

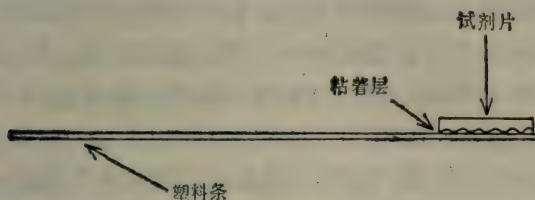


图 5.6 干试剂条全图。

多年来, 尿糖常规检测有助于糖尿病病人的迅速诊断。尿糖试验还有助于监测相对稳定的糖尿病患者的治疗(这类患者并不需要经常校正胰岛素的剂量)。另外, 尿糖试验对由限制饮食而控制疾病的糖尿病患者也是有用的。市售尿糖测定试剂浸入棒的优点是便宜、无侵入、无痛。但是有些学者已对这类简单的测定方法的可靠性提出了怀疑(Simpson 和 Thompson, 1977, 1978; Gupta, Goyal 和 Singh, 1982; Olesen, Mortensen 和 Molsted-Pedersen, 1983)。除使用者技术的差别外, 通常存在于尿中的葡萄糖氧化酶抑制物的浓度的变化与不可靠的结果有关。

现在人们意识到, 维持一个调节良好的血糖浓度可以降低与糖尿病相关的微血管并发症的发病率和严重程度。全血和血清葡萄糖检测试纸的发展, 使得血糖的测定几乎同尿糖测定同样简单。其方法是试纸条用乙基纤维素处理形成一层包被膜, 此层膜使小分子很易扩散通过, 还可防止细胞吸附于纤维素纤维上, 也可使细胞容易冲洗下来。

将一滴血滴于试剂纸条上, 经一定时间(一般为一分钟)后, 除去过量的血液, 试纸条上出现的颜色用标准色谱(一般印于试纸盒的壁上)进行比较, 据此对葡萄糖浓度进行肉眼估

计 (Kutter, 1977; Sherwood, Warchal 和 Chen, 1983)。市售反射光度计可用于对颜色的变化作定量分析。由小型袖珍反射测定计和试剂条组成的血糖测定盒已在医院辅助科室、糖尿病诊所以及糖尿病病人家里普遍使用。但是有人将其中的两个系统同以自动分析仪为基础的检验进行了比较,结果表明这些简单的方法是很不精确的 (Tomkin 和 Moore, 1977)。在急诊室里,这些试剂盒毫无疑问是有用的,但是, Tomkin 和 Moore 还是告诫医务人员不要依赖这些光度计测出的结果,而应尽可能快地与化验室估测的结果核对。

最近, Stewart 和 Kleyale (1983) 对家用试剂盒和已建立的化验室方法 (己糖激酶法) 测定的血糖进行了统计学比较。他们证明,一个有经验的操作者用试剂纸条测定可以得出可重复的结果。但在超常葡萄糖浓度时,所有的试剂盒测得的结果都有非线性的倾向。所比较的四种方法在低血糖浓度范围所给出的结果明显低于化验方法的测得值。Drucker, William 和 Price (1983) 报道,用袖珍仪器在化验室条件下测定出的结果精确而且准确。但在化验室以外的条件下,由医生或护士所进行的测定都没有得到令人满意的结果。

Kutter (1977) 讨论了快速临床诊断用试纸的详细用法及其应用的局限性。干试剂试纸必须贮存在湿度很低的容器中,将试纸装入一个备有干燥袋的密闭瓶里是容易做到的;但是,如果拿出试纸后,没有马上盖好容器盖,那么湿气会进入容器,使产品迅速变质 (King, Steggles 和 Harrop, 1982)。

Ames 小组改进了这种技术,他们应用一种高级专用微处理机控制反射光度计 (Seralyzer),可使干试剂试纸用于分析血清的 7 种不同成分。这种试纸应用吸附上的酶和适当的色素原对葡萄糖、尿酸、胆固醇和甘油三酯进行分析 (Zipp, 1981)。进行一次测定需要选择和插入适当的测试模数,这样

会自动地编排出专一性测试的指令。标准化以后,一条试纸放在恒温的样品台上,并且手动操作将 $30\mu\text{l}$ 的稀释血清用吸管注入仪器中,测定结束时,仪器发出信号,仪表盘里显示测定结果。在对 Seralyzer 进行评价时,Thomas, Plischke 和 Stortz (1982) 所做的工作表明,此法对葡萄糖、尿酸的测定是较准确的,但是当测定结果同已经建立的方法所得到的结果相比较时,有时会发现存在一定的差异。Stevens 等 (1983 a,b) 发现 Seralyzer 易使用而且可靠,具有“艺术状态”的表演标准。但 Clark 和 Broughton (1983a, b) 对这种性能缺乏热情,他们揭示出干试剂测定的缺点,他们特别提到样品体积和分析时间是测定的关键。由一个不熟练的操作者测得的结果会很不准确。

柯达公司 (Eastman Kodak Co.) 生产摄影材料具有丰富经验,他们从不同的途径寻求如何利用干试剂技术。现代彩色胶片的生产要求将 16 薄层化学物质依次铺盖于一个透明支持物上。尽管没有涉及摄影化学,但是柯达公司已经将此项技术应用于干试剂薄片的生产 (Curme 等, 1978; Shirey, 1983)。在一块透明的塑料片基顶端铺上一层或多层试剂,其中含有分析所必需的大部或全部试剂。亲水聚合体如明胶或琼脂糖用于这些层中以结合试剂。铺于试剂层上面的是多孔扩散层。在此类膜中的排放中,可使用多种物化现象,而其活性区常为 1cm^2 , $100\mu\text{m}$ 厚,图 5.7 所示是尿素分析片的横断面。当一滴血清接触到分析片时,样品先同多孔层接触,样品通过毛细管作用快速均匀扩散开来。扩散层的下面是试剂层,是用于血液尿素测定的,此层含有结合在明胶上的脲酶和缓冲剂 ($\text{pH}8.0$)。脲酶催化尿素水解成氨和碳酸氢盐,而后氨扩散通过由丁酸-醋酸纤维素构成的半透膜。这层膜位于试剂层和指示剂层之间,为的是减少氢氧离子扩散到

染料层。结合于无色指示剂的醋酸纤维层提供颜色形成层,这一层直接铺于透明支持物上。产生颜色后,就以白色扩散层为背景,反射透过透明支持物而测定出颜色的强度 (Spayd 等, 1978)。采用其他合适的酶系统,类似的原理已用于葡萄糖 (Curme 等, 1978)、胆固醇 (Dappen 等, 1982)、肌酐 (Sundberg 等, 1987; Toffaletti 等, 1983; Smith 等, 1983),以及甘油三酯 (Spayd 等, 1983) 的测定 (见 B 部分, 表 5.3)。

柯达公司已经发展了专门利用多层胶片技术的两种自动分析仪,即 Ektachem Glu/BUN 和 Ektachem 400 分析仪。这些仪器没有泵及管状结构,并在设计时将运动部分减少到最低限度。分析用干性胶片以单个薄片形式装在暗盒里,此暗盒贮放于仪器中。仪器内装有微处理机,也可控制仪器的功能,计算在试验过程中所得出的所有数据,并将这些数据转换成所需要的单位。Ektachem 每小时可完成 120 个不同的分析,并且该仪器只进行操作者所要求的试验指令。Cate 等 (1980) 报道了采用 Ektachem Glu/BUN 分析仪样机所取得的令人称道的经验。Banci 等 (1981) 论证了该系统的准确性、精确性和可信性等人们所期望的特点。但是以上两个研究小组的技术评价人指出,这种仪器对样品的粘度敏感。当血清中含有超常浓度的蛋白质时,其粘度可使葡萄糖测定值下降,这是由于超常蛋白质浓度时斑点直径的改变以及蛋白质对底片基质的干扰所致 (Cate 等, 1980)。此外,如果分析血清样品,不能用标准样品水溶液校准仪器,必须用标有特定 Ektachem 值的冻干血清作为对照和标准。Ektachem 系统的这种特点并不是例外,因为其他的仪器和方法也存在类似的问题。

Sundberg 等 (1983) 曾介绍了一种利用复膜技术测定血

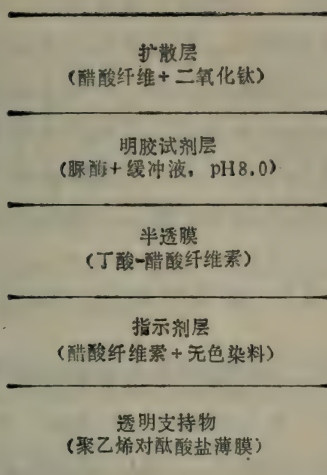


图 5.7 尿素测定的 Kodak Ektachem 干相薄片的层次图。
各层不是按比例画的。

清肌酐的新颖酶学方法。这种方法利用肌肝亚氨水解酶把肌酐水解成 N-甲基海因和氨。氨扩散过半透膜层,通过同溴酚蓝反应后进行定量测定。据说该法受干扰物质的影响要比广泛应用的 Jaffe 法小一些 (Smith 等, 1983; Toffaletti 等, 1983)。

如果短期内使用,试剂薄片可在室温下保存两个星期 (Cate 等, 1980)。如果要长期贮存,就需要将薄片放在密闭容器中,保存在冰箱 (4℃) 里。胶片的有限寿命可能是由明胶基质中残存的水和截留的酶的不稳定造成的 (Greyson, 1981)。

测定结果的质量几乎完全由生产出的薄片的精确度决定。保持薄片的标准将保证这种方法在临床分析中获得最后成功。

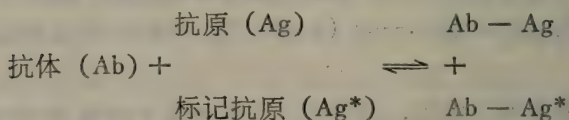
由于干试剂层片中的酶是一次性使用的,从而也就失去

了经济上的优越性,因为薄片或条用过一次后就丢弃。与已经建立的化验方法相比,可以发现这些系统的精密度和准确性都没有得到任何改进。然而,这种方法确有使用方便和简单等主要优点。人们可以设想将来的化验室是这样的:室内几乎没有试剂瓶和玻璃仪器,并可配备较不熟练的人员;Walter (1983)更详细地介绍了干性试剂化学。

5.5 酶免疫测定 (ELA)

最近发表了一些有关这个论题的综述 (Schuurs 和 Van Weemen, 1977; O'Sullivan, Bridges 和 Marks, 1979。Carrier, Bout 和 Capron, 1981; Blake 和 Gould, 1984)。Carrier, Bout 和 Capron (1981) 引用了 600 多篇文献,这几乎包括了最近 10 年来发表的全部文献。他们总结了 EIA 定量测定下列物质的用途: 这些物质是血清蛋白、凝血因子、免疫球蛋白、激素的抗体、多种药物、病毒、细菌和寄生虫。

免疫分析原理见以下反应式:



游离的标记抗原 (Ag^*) 同未标记抗原 (Ag) 分子竞争抗体分子上固定的、但数目有限的专一结合位点。经过一定的保温时间后,游离的和结合的抗原便彼此分离。然后测定某一段(含游离或结合抗原段)或全部的标记抗原的量。随着未标记抗原量的增加,同抗体结合的标记抗原的量就减少。由此绘制出标准曲线,并根据标准曲线测定生物样品中抗原的浓度。50 年代后期就已开始应用放射活性标记法,以后称为放射免疫测定法 (RIA)。在 70 年代早期开始应用酶标

法。个

RIA 可以不经预先分离便对存在于生物样品中的少量多种化合物进行直接测定。但放射标记法有一定的缺点：制备标记抗原可能会有害于健康；标记抗原的货架寿命可能很短，如使用 γ 射线同位素（例如 ^{125}I ）；必须安全地处理放射性废弃物及有机废弃物；测定放射活性的仪器昂贵等。这些缺点使人们去探求其他种代用标记物，其中酶是目前最常用的。表 5.5 列出了酶标法的优缺点。

表 5.5 酶标法与放射标记在免疫测定中的比较

酶标法的优点

1. 在标记或处理废弃物时，无放射性危险存在
2. 标记产物货架寿命长
3. 所用仪器便宜，并且是常用仪器
4. 均相测定可在几分钟内完成

酶标法缺点

1. 血浆成分会影响酶活性
 2. 酶活性测定可能会比测定某些类型放射性同位素更为复杂
-

定量 EIA 有两种类型：非均相法和均相法。非均相 EIA 中，最后所要测定的结合标记物必须同游离的标记物分离，这同 RIA 法一致。而均相 EIA 中，抗原和抗体的相互作用会改变酶标记物的活性，而所要测定的正是这种酶活性的变化，所以没有必要再进行分离。均相测定法的优点是迅速（如有这样的要求），而且还容易自动化，但也有对血浆成分干扰很敏感的缺点。

5.5.1 酶标记物的制备

理想的酶标记物应该是稳定的，并且测定时发生的化学反应不会影响酶的活性。也希望抗体同抗原或半抗原的专一

性相互作用不因与酶的结合而发生改变。半抗原是小分子物质,如药物、类固醇,它们一般不是免疫原,但当它们同一个大分子载体蛋白结合时,就会成为免疫原。

使酶同抗体、抗原或半抗原交联的反应类似于形成固定化酶所用的反应。A 部分第 4 章讨论了这些反应的化学。

形成酶标记抗原或酶标记抗体最常见的反应如下:

1. 戊二醛法 (Avrameas, 1969)——二醛基通过蛋白质的氨基与蛋白质相连接。主要缺点是两种蛋白质的自身交联。如果反应是两步而不是一步进行,那么会减少自身交联 (Avrameas 和 Ternynck, 1971)。

2. 过碘酸法 (Nakane 和 Kawaoi, 1974)——这种方法限于用于糖蛋白,例如过氧(化)物酶。过碘酸用于氧化酶的糖基,然后醛基才会同抗原蛋白质的氨基反应。

3. 马来酰亚胺法 (Kato 等, 1975)——这种方法通过使两种蛋白质上的巯基 ($-SH$) 相连接而使蛋白质相结合,或者同抗体上的氨基相连而使抗体同酶相结合 (O' Sullivan 等, 1978b)。后一种反应可以减少自身聚合量。

可通过数目有限的反应生成酶标半抗原:

1. 混合酞法 (Erlanger 等, 1959)——半抗原羧基同酶的氨基形成肽键。

2. 碳二亚胺法 (Tateishi 等, 1977)——此反应也是在半抗原和酶之间形成一个肽键。如果有必要,可在含羟基的半抗原上引入羧基。

3. 双功能亚胺盐法 (O' Sullivan 等, 1978a)——半抗原氨基和酶的氨基之间形成交联。

5.5.2 非均相 EIA

Engvall 和 Perlmann (1971) 首先将固相支持物应用

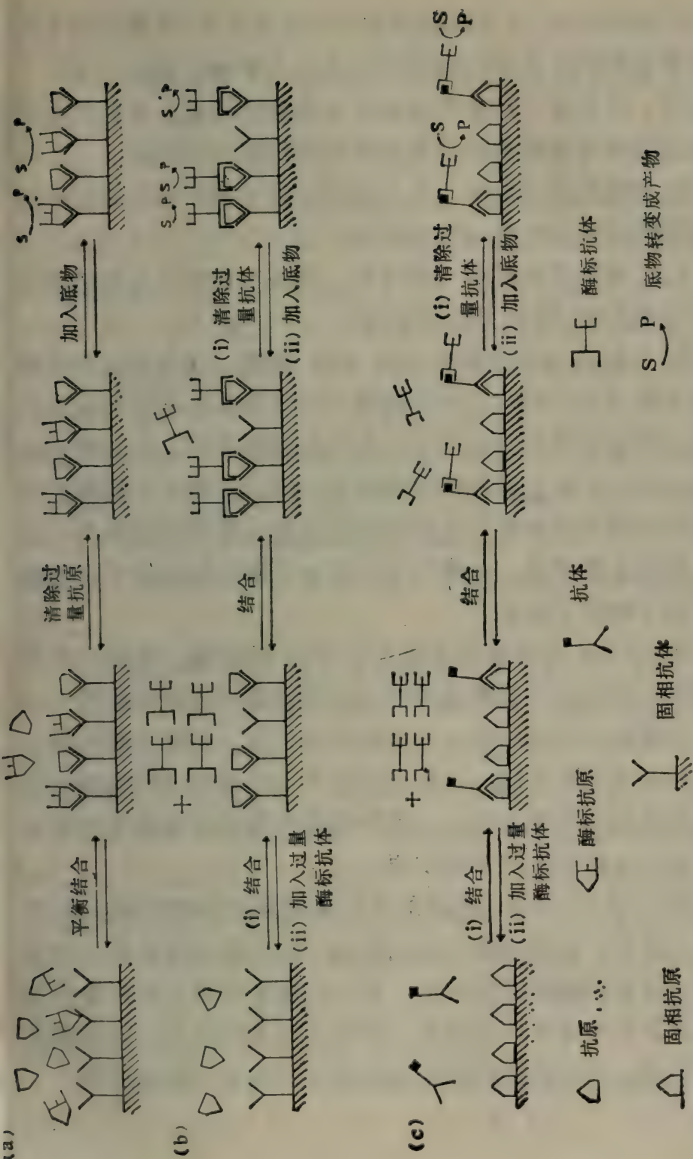


图 5.8 市售非均相 EIA 原理, (a) 抗原的直接夹心层 EIA, (b) 抗体的直接夹心层 EIA, (c) 抗体的竞争夹心层 EIA。

于非均相测定法,这是目前最常用的分离方法,并且已用于所有市售非均相体系中。固相部分是由各种塑料制成,以多个样品槽、样品珠、样品小杯或样品管形式出现。这种类型的测定方法通常被称为酶联免疫吸附测定法(ELISA)。这些测定所用的抗原或抗体连在固相表面上的,这种连接或铺涂过程的可重复性是十分必要的。

已经发展了几类非均相 EIA。图 5.8 介绍了市售临床常规化验使用的 EIA 系统的原理。

图 5.8(a) 为抗原的竞争性 EIA 原理。这个方法与经典的竞争性 RIA 类同。反应的第一阶段是样品或标准液中的标记抗原与非标记抗原竞争已吸附在固相表面上的数量有限的抗原专一抗体。冲洗掉过量抗原。结合于抗体上的酶标抗原量与样品中的非标记抗原浓度成反比。然后测定结合于固相上的剩余酶活性。如果用半抗原分子取代抗原分子,则此法可用于测定半抗原。

图 5.8(b) 为抗原的直线夹层 EIA 的原理。在反应的第一阶段,将样品或标准液中的抗原同过量的固相抗原专一抗体一同保温。冲洗后加入过量的酶标抗体,在测定酶活性以前先冲洗去过量的酶。这种测定法中,结合于固相的酶活性同样品中的抗原量成正比。这种类型的测定仅适用于测定具有一个以上抗原决定子的抗原。

图 5.8(c) 介绍了抗体的直接夹层测定法的原理。反应的第一阶段,过量固相抗原同样品中的抗体一同保温。冲洗后加入过量的酶标第二抗体。第二抗体是由第一种抗体引发的抗动物免疫球蛋白的抗体。冲洗去过量的酶后,测定结合酶的活性。其活性同样品中的抗原专一抗体的量成正比。

5.5.3 均相 EIA

最常用的均相 EIA 是酶多重免疫测定技术或 ÉMIT [(c), Syva Maidenhead, U. K.]。

图 5.9(a) 为这种测定法的原理。它取决于半抗原专一与抗体结合时,半抗原吸附的酶所发生的抑制。标准液或样品中的游离半抗原与抗体竞争,从而解除这种抑制。所以酶活性与样品中的游离半抗原成正比。抗体对酶活性的抑制可能是由于 (1) 通过空间位阻阻止底物接近酶的活性中心; (2) 引起酶的构象变化; (3) 阻止酶活性所必需的构象变化 (Rowley 等, 1975)。从甲状腺素的测定中可发现另一种不同的机理。此时,甲状腺素-苹果酸脱氢酶结合物没有酶的活性,但当结合到抗甲状腺素抗体上时,酶被激活 (Ullman 等, 1979)。很明显,甲状腺素是通过同酶的活性中心相结合而抑制酶的。而抗体将甲状腺素从活性中心移掉,从而使酶重新活化。

另一种均相 EIA 体系采用底物标记半抗原 (Buid 等, 1977), 图 5.9(b) 介绍了这种方法的原理。酶的底物是同待测半抗原共价结合的,例如,伞形酮-艮他霉素可被 β -半乳糖苷酶水解产生荧光产物。样品中的半抗原同底物标记半抗原竞争半抗原专一抗体上的数目有限的结合位点。结合抗体的底物标记半抗原分子无底物活性。所以,荧光产物生成的速度或者总的荧光产物量同样品或标准液中的游离半抗原的量成正比。这类测定不利用酶促催化的放大效应 (而其他类型的 EIA_s 可以利用这种效应)。这会降低灵敏度,但采用灵敏的荧光分光光度法能适当补偿这种缺点。

已有人记述了测定甲状腺素的均相酶抑制物免疫测定法 (Finley, Williams 和 Lichti, 1980), 图 5.9(c) 为该法的原

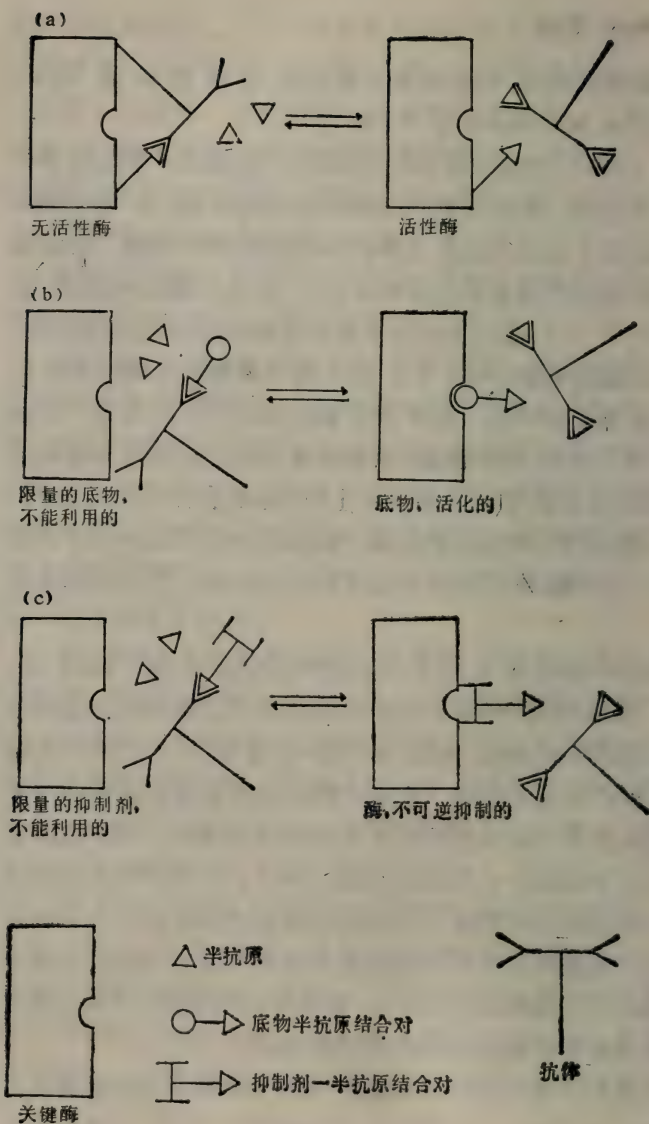


图 5.9 市售均相 EIA 的原理。(a) 半抗原标记 EIA, (b) 半抗原标记底物 EIA, (c) 标有不可逆性抑制物的半抗原 EIA。

理。甲状腺素在同磷酸盐共价结合后,就可成为胆碱酯酶的不可逆抑制剂。但是,如果结合对是同甲状腺素专一抗体相结合,其抑制作用就会消失。由于甲状腺素和结合对都可竞争抗体,所以测得的酶活性同样品中的甲状腺素含量成反比。

5.5.4 酶标的选择

酶起标记物的作用,这是由酶催化的反应所决定的。这会引起放大效应,所以每一个活性酶分子都可使很多底物分子转变成产物。理想的酶标要具有表 5.6 所列的特点。在实际应用中,所采用的酶有限,因此在每项测定中都应考虑到这一点。大部分酶来源于细菌或蔬菜。

表 5.6 理想酶标的特点

-
1. 在抗原-抗体结合的最适 pH 条件下,酶具有高比活性
 2. 酶有一些反应基团,通过这些基团,酶与抗体、抗原或半抗原结合,而且酶和免疫活性的损失降到最低限度
 3. 在贮存和测定条件下,有稳定的酶标结合对
 4. 测定液中不存在酶活性和影响酶活性的因素(均相 EIA)
 5. 廉价、准确、敏感的测定方法,最好选用比色测定
 6. 可使用价廉的可溶纯酶
 7. 不存在由酶、底物或辅助因子等带来的有害健康的东西
-

B 部分表 5.4(a) 列出了以试剂盒(配套)方式进行非均相测定的最常用的酶。Ishikawa (1980) 和 Yolken (1982) 全面深入地讨论了这些酶有关的特性。过氧化物酶是表中列举的最便宜的酶,它是糖蛋白,所以它可以用过碘酸法形成结合对。防腐剂、氧化剂或还原剂都可使该酶失活。用比色法可以测出皮摩尔量水平的酶。一些色原已被用来显示酶活性,但是所有这些色原都有缺点。最灵敏的是邻-苯二胺,属

光敏性。2, 2'-连氮-2, 2-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)是昂贵的,并且产物不稳定; 5'-氨基水杨酸灵敏度差; 邻-甲基苯胺和邻-苯二胺对实验动物有致癌和致突变作用。碱性磷酸酶和它的结合体非常稳定。小牛小肠酶在皮摩尔水平即可被检出,但是纯酶很贵。最近增列到表中的脲酶的终点产生深紫色,有人认为这样可很容易用肉眼检测出阳性结果。并且还有人断言,它的定量分析同其他酶标一样灵敏。用比色法也可以检测出皮摩尔水平的 β -半乳糖苷酶,并且这种酶具有过氧化物酶和碱性磷酸酶所不具备的优点:动物细胞中不存在这种酶。这可说明为什么它是上述酶中唯一可用于均相测定的酶。溶菌酶是第一种酶标的酶,仍用于半定量测定尿中存在的多种药物,测定范围为 mg/L。更灵敏的定量测定血清成分的方法是有可能做到的,这里以 6-磷酸葡萄糖脱氢酶作为酶标。这种酶来自肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*), NAD^+ 是酶的一种底物,这可以避免用人红细胞 6-磷酸葡萄糖脱氢酶可能出现的干扰,因为后者只对 NADP^+ 专一。有几种测尿系统是采用较昂贵、但较敏感的苹果酸脱氢酶。在血清成分的均相测定时,这种酶对干扰敏感。

5.5.5 EIA 系统测酶

在非均相 EIA 系统中测定酶时,如通过 pH 变化,在某特定的时间,反应终止在反应进程曲线的线性部分(图 5.1)。保温、冲洗和酶测定的全过程可由目前应用的仪器容易做到自动化。单个样品测定大约需 2 小时,但每一次可检测 100 个样品。

均相 EIA 系统通常采用动力学测定法,尽管需要另外花时间绘制校正曲线,但可在 1—2 分钟内完成一个样品的测定。过程也可自动化,可在约 20 分钟内一次进行 30 个样品

的测定。

主要利用分光光度法测定酶活性,常用前面所讨论的相同的终点(见 5.2、4.1、5.2、4.2)。 β -半乳糖苷酶可用比色法或荧光法进行测定,后种测定方法约比前一种方法灵敏 100 倍。溶菌酶的测定不太常见,通常采用浊度法进行测定。

5.5.6 两个半抗原的同时测定

EIA 的一个潜在优点是可比较容易地同时对两个半抗原进行测定。Wisdom (1976) 首先注意到了这种可行性,但直到最近才有人 (Blake 等, 1982) 公布了第一个工作系统。这个系统同单个半抗原测定法相比,优点是:节省试剂费用及样品体积,并可减少测定时间。

Mitsuma 等 (1972) 实现了利用两种碘同位素 ^{125}I 、 ^{132}I 对两种半抗原同时测定。但这种方法的实用性受到 ^{131}I 半衰期短及两种同位素产生 γ 射线缺乏理想的分辨能力的限制。

已有人利用两种半抗原同时用 EIA 测定了甲状腺素和三碘甲腺原氨酸 (T_3) (Blake 等, 1982)。与甲状腺素形成结合对的碱性磷酸酶,是在 540nm 波长处通过测定水解一磷酸酚酞所释放出的酚酞进行检测的。第二个酶是同 T_3 形成结合对的 β -半乳糖苷酶,它可水解底物邻-硝基苯酚- β -半乳糖苷,生成的邻-硝基苯酚可在 420nm 处进行测定。有两个反应终点就可以做到在同一试管内测定每一个半抗原。

5.6 展 望

至今,已经对酶的临床分析的四个方面做出了综述,其中的两个方面,代谢物和酶的测定法已很好地建立起来了。近 10 年来,基本的一套方法变化甚微,但是日益增多的高级精

密仪器的应用增加了单个样品的测定数和单位时间内测定的样品数。将来还会涌现出许多种可进行更多种测试的高级仪器,但是这些仪器也只是起鉴别作用,内科医生仅仅利用这些仪器进行他所需要的测定。本综述的第三部分讨论了固定化酶,这种方法的影响还在增加。干试剂法还处在萌芽阶段,但是由于这种方法优于常规的湿化学法,所以它的发展将是迅速的。根据这样的发展速度,我们可以预料,今后会推出更多袖珍的、操作简单的仪器,用于内科医生诊所或直接用于病床旁。最后一部分介绍了一种相当有潜力的、有效的和多用途的技术——EIA。由于有均相和非均相自动化测定的高级仪器,EIA 的应用范围还在不断扩大。由于酶在临床分析中的应用具有方便、专一和重复性好的优点,其应用不但将持续发展,而且测定范围也将不断扩大。

B 部分 酶和细胞的工业利用

第 1 章 酶利用引言

A. 怀斯曼

本书 B 部分将介绍酶的大规模分离和提纯、酶的固定化以及游离酶和细胞、固定化酶和细胞的种种工业应用,并向对这些领域的理论和实际应用的详情感兴趣的读者提供有关资料(对应于 A 部分各章)。上述应用已扩展到临床化验室,最近已取得了振奋人心的进展。

对于目前的工业用酶,有人提出了许多建议。在这个飞速发展领域的一般综述里不可能充分讨论为数众多的其他酶。本书第一版问世后的 10 年中,酶的应用显然已取得了良好的进展,但在酶的主要应用上依然起色不大,开拓面也相对较少。在生产具有足够稳定物理状态的酶方面,有许多基础和应用工作都还没有做。将来要使用由重组体 DNA 技术制备的“剪接”酶 (“tailor-made” enzymes),最终将使用合成酶和模拟酶。这方面的综述请参阅 Wiseman (1984 年) 的文章。重要的综述可参阅 Dunnill, P. 1984 年写的“生物技术和英国工业” (“Biotechnology and British Industry”) 这篇文章。有关酶在食品分析中的应用请参阅 Wiseman 1981 年写的文章。

第2章 大规模蛋白质提纯的 实用概况

M. D. 斯卡温 J. 梅林

2.1 引言

A 部分第 2 章中讨论的主要是与各种酶纯化技术有关的理论问题和基本原理。这一章准备简述某些有关的实际问题 and 设备。由于篇幅有限,不可能进行广泛深入探讨,但在承担大规模工业提纯酶时,本章仍可以作为考虑某些较重要关键点的指南。一般情况下,我们将只详细列出制造厂以及我们较熟悉的这些工厂的产品细目。如果遗漏了某个厂家或某项设备,那么不应该理解为对他们有什么偏见,而只能怪作者无知。

下面列出的一些项目一般都涉及酶的提纯,其中终产物具有某些治疗用途的,可遵循 Medicines Act 1968 年的专门规定。一本叫做《制药实用指南》[Guide to Good Pharmaceutical Manufacturing practice (HMSO)] 的小册子适用于这些治疗物质。但小册子列出的许多要点对所有过程的控制都是通用的。

作者打算尽可能用本章内容补充 A 部分的相应章节,以使工艺和设备的信息更利于读者使用。

2.2 酶失活作用

在大规模酶提取过程中不是物理损失,而是失活引起的产品损失,这是一个极难解决的问题。1972年 Thurston 提出需考虑到的有关培养状态的某些问题,其中有几点对酶提纯是适用的。

用确保 pH 和温度不超过酶稳定限度以及避免起泡和高剪切状态等办法可以使酶损失降至最低。即使如此,损失仍可能发生。现在已越来越清楚,酶失活过程中,尤其在纯化的前几个阶段,蛋白酶常引起酶失活。

选择适宜的 pH 和温度条件,或者添加抑制剂可以使细菌蛋白酶的活性下降。前一种办法用在从大肠杆菌中提纯青霉素酶的效果不错,即在第一步纯化时维持 pH 在 6.5—7.0,这样可防止由于碱性蛋白酶作用引起的青霉素酶损失 (Melling 和 Scott, 1972)。其他措施为添加 EDTA 来抑制依赖钙的蛋白酶,而丝氨酸蛋白酶对苯甲磺酰氟 (phenylmethyl sulphonyl fluoride) 敏感 (Gold, 1965; Callow 等, 1973)。然而,苯甲磺酰氟除和敏感蛋白酶的活性丝氨酸残基作用外,还和其他羟基作用,其中最重要的是水的羟基。这表明在 pH 8.0 25°C 的水溶液环境中 100 $\mu\text{mol/L}$ 的苯甲磺酰氟的半衰期约为 30 分钟,而在 pH 7.6、4°C 下,则增至 20 小时左右 (James, 1978)。

有许多金属酶,其分子中含有一个或几个保持酶活性和蛋白质稳定性所必须的金属原子。在这种情况下,除螯合剂专一于蛋白质结构金属以外的金属,必须避免使用螯合剂。提纯这种酶时,抽提所用的缓冲液通常都要含有活性和稳定性所必须的特定金属。

2.3 容器和附属设备

2.3.1 玻璃容器

对于小规模酶研究,硬质玻璃是理想的材料,除强氢氧化钠溶液外,它抗腐蚀,无毒性。然而,对大规模操作来说,玻璃容器有一些缺点,如缺乏结构强度,可以对操作者构成危险,投资上很难掌握准确,又缺乏通用性。

2.3.2 金属容器

容器由软钢、铜合金构建,一般不用铝制造,因为铝易腐蚀。金属容量通常用作发酵容器和酶分离容器。然而,不可避免地也有例外。Lingood 等人(1955)却用铝合金制作的容器来产白喉毒素,因为这种毒蛋白需要避开铁离子。

尽管铜在某些不和工艺过程液体直接接触的外围设备的制作中很有用,但在有可能污染产物的设备制作中应尽量避免使用铜。对于常用的压缩空气的管道、水管、冷却水管和通气管道以及容器夹道,软钢是常被选用的材料。上述条件下使用的金属可用镀锌保护。这些材料也可用于制作各种用途的硬配件。为使组件达到多用,容器和设备之间要用橡胶、聚乙烯、聚氯乙烯或尼龙制的软管件来联结。

制作容器所用材料的质量标准,过去都是根据发酵工业的经验确定。容器通常由不锈钢制成,但正如 Solomons (1969)所指出的,不锈钢有 50 种以上的型号,并不都能经受住各种条件。Elsworth 等人(1956)列出了适应于制造发酵容器的各类不锈钢,它们是奥氏体镍铬钢 BS No. En 58M, En 58B 和 En 58A。它们可抗氢氧化钠水溶液、氨水、磷酸和硝酸。在 pH1—2 下操作时,BS No. En 58J 系列钢比

较耐柠檬酸和硫酸等。不锈钢耐腐蚀是由于在金属表面形成了含铬量高的氧化层。

不锈钢容器完全适应于酶的提纯。容器上溶出的金属离子可用添加 2—10 mmol/L EDTA 来解决,经螯合作用 EDTA 能有效地从溶液中除去这些金属离子。不锈钢容器有不少优点:易冷却,通过夹套循环致冷剂容易使系统维持在低温(如+8℃);搅拌装置构建牢固,容器中装有 pH 电极:容器牢固耐用,消毒清洗方便;在加压或维持特殊气相环境的状态下能正常发挥功能;如需要改装也容易做到。

2.3.3 塑料容器

用聚丙烯做成的容器既可用于硫酸铵一类腐蚀性物质,也可用于一些怕金属污染的产物。当然,要使容器完全避免金属是困难的,因为搅拌机械通常都是金属轴;维持低温最有效的办法是插入金属冷却盘管。在处理以硫酸铵为沉淀剂的高浓度电解质溶液时,塑料容器减少了酶溶液和金属接触的表面积,避免了腐蚀。

尽管大多数塑料是惰性的、无毒且能耐受许多化学药品的腐蚀,但它们含有可浸出的增塑剂、成型剂和充填剂等物质。因此,在进行大规模酶加工以前,对塑料容器必须考虑到酶与塑料中有害物质接触所导致的酶失活或污染的可能性。塑料容器的结构强度不如钢制容器,当容器的容量加大时,必须给与支撑以增加承受能力。搅拌设备的附属装置也需要坚固的支架。此外,灭菌是个难题。塑料容器不能用加热灭菌,而化学灭菌可能会引起产物污染。不管用什么材料做容器,随着容器尺寸的增加,都面临着温度和 pH 控制问题。

热传递是在容器表面进行,因此通过容器夹套的冷却水或乙二醇的循环直接影响温度的控制。随着容器容积的增

大,热传递的表面积相对减少 ($V \propto r^3$, $A \propto r^2$)。这个问题可通过增加冷却剂的流速和改善混合器效率部分得到解决。快速冷却的一种改良方法,是用薄板冷却器之类的高效热交换系统循环过程液。在热沉淀杂蛋白时的较高温度,也可用类似的办法实现。

在特定的容器中,添加酸或碱的混合效率,在很大程度上决定着 pH 控制效率。搅拌罐的混合效率受容器尺寸、形状、搅拌速度、叶轮设计、挡板或其他内配件等因素的影响。Butters (1969) 曾专题评述过混合问题。这篇文章可作为进一步研究的参考。产物的粘度对提高混合效率起阻碍作用,高度聚合的核酸会严重妨碍搅拌器的正常运行,混合不充分,使加入的酸或碱因局部过浓而导致酶失活。

2.4 液体输送

2.4.1 连接器

在实验室内,液体从一个容器输送到另一个容器是一种简单的操作。但在涉及几百升液体的输送时,某些具体细节就会出现。图 2.1 表示用重力输送或泵输送,将液体从一个容器转到另一个容器时所允许的最大弹性的配置图。容器可以直接和其他设施连接,也可以通过各种由挠性管组成的连接件相连。各种类型的连接管均适用,包括 Albang (W. H. Wilcox & Co. Ltd, P. O. Box 23, Southwark Street, London, U. K., SE1 1RX) 和 Kamolck (Dover Corporation, OPW Division, Cincinnati, USA) 配管,这些都能提供快速而简便的连接技术。

2.4.2 泵

流速从每小时几毫升到几百升的各种泵都可选用。Solomons (1969) 曾作过这方面的专题评述, 需详细了解泵体设计和制造厂的读者可以参阅他的这篇文章。

为了尽快输送大量含酶溶液, 所用的泵应是低剪切型的, 还应避免起泡。输送含颗粒的悬浮液时, 用无阀泵可避免阀座问题, 一般情况下, 这种类型的泵也会出现某些问题, 而用自引液的泵是有好处的。

计量泵能有效地添加规定量的试剂, 但为保持生物材料的生存能力, 更常见的是监测 pH、电导率及其他相关参数的变化, 测定试剂的添加量。

蠕动泵广泛地用在和柱层析相连接, 在低压条件下它们以简单方式输送各种液体。

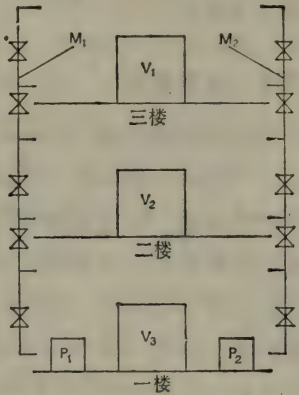


图 2.1 液体输送配置图。
X 表示阀门; V_1, V_2, V_3 表示容器或其他附属设备; P_1, P_2 表示泵; M_1, M_2 表示固定接头。

2.5 细菌破碎

2.5.1 再悬浮

无论是深冻的细菌泥还是直接从离心机中得到的细菌糊, 破碎前都需要重悬浮到水中或缓冲液中。这通常是用手工搅拌或简单机械搅拌完成的, 有时需用较激烈的方法。--

般用 20 升的工业食品混合器就可满足需要。在需要较强的搅拌时可用 Turmir 掺和机 (Tech, A. G., Utogual 31, Zurich, Switzerland), 容量为 30 升, 还可装配上不锈钢筒, 适用于动物和植物组织的破碎。另外, Silverson 型混合机可以用在任何容器上, 能产生高剪切力, 且不起泡 (Silverson Machines Ltd, Waterside, Chesham, Buckinghamshire, HP5 1PQ, UK)。

2.5.2 液体剪切

用液体剪切和 Manton Guālin 匀浆器 (A. P. V. Co. Ltd, Manor Royal, Crawley, Sussex, UK), 对于破碎公斤量细菌是一种有效和相对简单的装置。重要的是细胞悬浮物要分散均匀, 无冻块或外来杂物。操作失败往往是由于有外来杂物, 如木片、橡皮筋、垫圈等都会引起麻烦。这些物品通常是在抽提时带入匀浆器的, 导致吸入阀或非回水阀失灵, 或造成匀浆阀和冲击环堵塞。

清洗和保养整个系统是必不可少的, 机器用完后要用清水冲洗, 然后拆卸, 所有部件都必须逐一用热水清洗、弄干。在机器重新装配以前, 要核对活塞垫圈是否磨损, 必要时应更换, 在上面阻尼器活塞腔内要加满润滑油。匀浆器装好后, 要在操作条件下用蒸馏水调试。

如果阻尼器(或缓冲器)的针阀没有拧紧, 在高压条件下就有可能爆出。为消除这种危险, 可把匀浆器安装在隔离舱内, 以确保操作人员和其他人员的人身安全。

温度控制可能是一个问题。我们曾做过记录, 进出口温度相差 20℃。保持低温进料可以减少酶损失, 可将出口连接到薄板冷却器上, 使放出的、破碎好的悬浮液直接进入冷却容器。匀浆化后, 由于 DNA 的缘故, 粘度上升是不可避免的,

添加少量核酸酶就可使粘度降低。

有意思的是,匀浆器可以在不损坏细胞和菌毛的情况下从细菌表面除去菌毛。细胞破碎的操作条件随细菌类型、细胞浓度和酶在细胞中分布部位的不同而不同。非结合型细菌的胞内酶,在正常情况于 55MPa、10—20%(w/v) 的菌体浓度下一次破碎就可释放出来。而像铜绿色假单孢菌的细胞色素这一类膜结合酶,在 55MPa 下需要三次破碎方能释放。

最常用的是两种型号的 Monton-Gaulin 匀浆器。可用作一级或二级匀浆机的 15 M-8BA 型,处理量为每小时 54 升,最大操作压力为 55MPa。大型匀浆机 K₃ 型是两级匀浆机,处理量为每小时 250 升,最大操作压力是 35MPa。

因为它们是低压,大容量匀浆器采用一次破碎方式匀浆时,破碎细菌细胞的效率较低。多次破碎,或连续循环,或连续放出循环,都可提高操作效率(Charm 和 Mateao, 1971)。用上述方式操作匀浆器时,匀浆液的温度上升很快,流出液必须进入薄板热交换器或类似的高效冷却系统。

2.5.3 研磨

某些生物特别是革兰氏阳性菌,用液体剪切匀浆是难于破碎的,但用玻璃珠研磨却是一种有效的方法。由 Raheck 等(1969)设计的玻璃珠磨的原理在前面已作过介绍。

最小的细菌磨 Dynomill (Backhoffen, 4000 Basel 5, Schweiz, Switzerland) 是 KDL 型磨,使用时既可配上批式容器,也可配上连续研磨容器。

通常采用的是 300ml 容积的批式容器,一次能够处理 200ml 的细菌悬浮液。它的用途在于,在使用连续式研磨机前,用这种批式容器确定破碎时间、菌体浓度、缓冲剂组份等条件。

当用连续研磨容器时,细菌悬浮液以某种速度泵入容器内,即细菌悬浮液在研磨容器内的平均滞留时间要等于用间歇容器时所确立的破碎所需的时间,可用公式 $D = F/V$ 来表示,式中 D = 稀释率, F = 流速 (L/h), V = 研磨容器中除掉玻璃珠后的悬浮液的容积。这样,平均滞留时间 = $1/D$ 。

实践中发现,当细菌悬浮液浓度为 10% (w/v) 时,用 0.1mm 的玻璃珠通过 0.6 升容器的最大流速为 12L/h。它适用三种革兰氏阳性细菌和面包酵母。然而也可采用浓度达 20% (w/v) 的细菌悬浮液。

有时也可用较大的研磨机。KD5 (5 升连续研磨容器) 和 KD15 (15 升连续研磨容器) 也曾用来破碎微生物细胞 (Dunnill 和 Lilly, 1972)。然而这种大研磨机必须用较大的玻璃珠 (0.25—0.5mm), 因为这些大型机器的分离系统不能截留住细玻璃珠,因此对细菌的破碎效率将显著降低 (Hedenskog 等, 1969)。

Woodrow 和 Quirk (1982) 研究了 Dynamill KDL 细菌磨中细菌释放出两种 β -内酰胺酶和一种羧肽酶 G_2 的情况,发现在搅拌速度为 15m/s, 细胞悬液浓度为 1:22.5 (w/w) 时, 0.25mm 的玻璃珠能产生满意的结果。羧肽酶连续释放的最适流速是 15 升每小时,滞留时间为 1.6 分钟。此结果表明,小规模组件每小时可破碎 4kg 细菌,而用 KD5 这样大型研磨机,每小时可处理 100kg 细菌。

玻璃珠打浆室 (bead beater) (Life Science Laboratories, Bedford) 是 Dynamill 型设备的一种用于小规模试验细菌酶释放的附属设备。并提供专为批式操作设计的 15—350 ml 容量的研磨容器,绝大部分细菌经 1—3 分钟就有 95% 被破碎。

最近,瑞典公司 Innomed-Konsult A. B., Stockholm 推出一种用于细菌破碎的球磨机。这种球磨机在搅拌轴和传动马达之间用磁偶合,因而避免了传统设备的复杂分离系统,并且可以采用 0.1mm 的玻璃珠达到较高的破碎效率,据称这种设备用 2.2 升的破碎室,处理能力达 50 升每小时。

Dynomill KDL 的优点是可用于破碎致病菌,它在大小和设计上有可能安装在一个安全舱中 (Melling 等, 1973)。

2.6 离 心

离心的原理是十分清楚的,在前面 A 部分第 2 章就决定省去这一内容,但是有些问题还值得介绍一下。

球形颗粒的沉降速率用下面的方程式表示

$$V = \frac{(P_p - P_L)gD^2}{18\mu} \times F_s$$

式中 F_s 是有碍沉降中颗粒相互作用的校正因子,它用下式表示

$$F_s = \frac{X_L^2}{10^{1.82}(1 - X_L)}$$

D 是颗粒的直径, g 表示引力场, V 是末端沉降速度, X_L 是液体占有的容积部分, μ 是悬浮液粘度, P_L 是液体密度, P_p 是颗粒密度。

颗粒运动的距离是 Vt , t 是颗粒在引力场中的时间。颗粒紧附在要去除的表面,只有与表面相距 Vt 的那些颗粒才能沉淀。在离心机的设计中这一点显然是最重要的。从大量的工艺过程液中形成蛋白质沉淀,并较彻底地除去和回收,这已由 Bell 等 (1983) 作过广泛的专题评述。

2.6.1 批式离心机

离心量从小于 1 毫升到高达数升,离心力可达 100 000g 的各种各样的批式离心机种类很多。对于细菌细胞、细胞碎片或蛋白质的沉淀,离心力 20 000g 已足够,能处理相当数量材料的这类离心机的型号为数并不多。

例如, Sorval RC3-B 型或 Beckman J6B 型离心机可以装有 6 个 1 升的容器(离心管),离心力 5 000g, Sorval RS5-B 型或 Beckman J2-21M 型能装配 6 个 500ml 的离心管,离心力为 13 700g。这些离心机或其他工厂制造的类似离心机是大规模酶纯化必不可少的附属设备。这种型号的离心机,大部分也可使用连续式转子,但沉淀物的容量限制在 300—800ml。

2.6.2 连续式离心机

在大规模酶精制的早期阶段,首先必须从数百升悬浮液中除去固形物。用连续式离心机处理,固形沉淀留在离心机的转鼓内,澄清的上清液将连续流出。

连续式离心机有三种设计类型,都可容纳数公斤固形物,并以相当高的流速进行操作。这三种是碟片式离心机(disc type centrifuge)、管式离心机(hollow bowl centrifuge)和篮式离心机(basket centrifuge)。

碟片式离心机

碟片式离心机见图 2.2。在特定情况下不停机,沉淀的固形物可以间断排出。然而,使用这种离心机的一些经验告诉我们,当排放固形物时,可能由于产生高的剪切力,使酶活性有损失。但是不排放固形物的碟片式离心机对澄清十分有

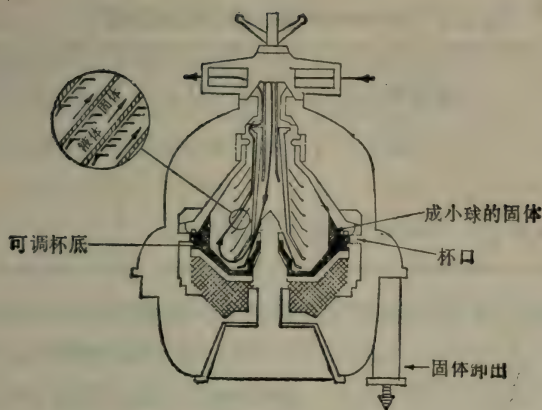


图 2.2 连续碟片式离心机
(Charm 和 Matteo, 1971)。

效。

这些离心机的碗碟式转鼓中心有一叠锥形碟，它可保证流体循环路程的长度不变，即使在碟壁上有固形物沉淀，也仅使流体循环路程稍有缩短，因此，工艺过程的损失很小。然而清洗很费事，也难免损失沉淀物，同时再装配也很费时间。

由 De Laval Separator Co., New York, USA; Westfalia Separator Ltd., Wolverton, Bucks, UK; Bird Machine Co; South Walpole Massachusetts, USA 等厂家生产的碟片式离心机均可供选用。它们的固形物容量达 20kg, 操作时的离心力为 8 000g。由于离心物料的性质差别很大，基本上是靠经验来选择适宜的流速。

管式离心机

为了获得足够长度的流体循环路程，这类离心机有一管式转筒，固形物沉积在转筒上(图 2.3)。随着离心时间延长，转筒的有效直径缩短，离心力也随之变小。然而这样的离心

表 2.1 Pennwalt 管式离心机的特性

型 号	转筒容量 (湿沉淀, g)	最大相对离心力 (RCF)	转筒重量 (kg)
T-41-24Y	200	50 000 或 13 000	1.4
A. S. 16	3 500	13 000	27
A. S. 26	5 200	16 000	63

机容易清洗, 采用可剥离的转筒衬垫, 沉淀物的回收可达 100%。再装备也简便。Carl Padberg, bahr, West Germany 制造的离心机被广泛采用, 但 Penn watt 离心机是这一类中知名度最高的, 详细规格列于表 2.1。

流速还是凭经验来确定。对于细胞破碎后的沉淀碎片, 如果用表中较大两种型号的离心机, 流速可为 50 升每小时。



图 2.3 空杯离心机。

篮式离心机

这类离心机的离心力比前述离心机低得多 (两者的转速比是 1 000rpm : 10 000rpm)。实际上它们是一种离心过滤机, 转鼓上有孔可排出滤液。某些滤布也常用作多孔转鼓的衬布。这类离心机的主要用途是收集大颗粒材料, 在酶提纯中即指离子交换用的纤维素或树脂。在酶批式吸附时可用篮式离心机收集颗粒材料, 离子交换柱再生或平衡时, 也可用这类离心机。

最简单的实例或许要算家用旋转脱水机。它的主要缺点

是容量小,不能连续操作。工业上有各种大小的篮式离心机可供使用(由 Carl Padberg, Lahr, West Germany 和 Thomas Broadbent, Huddersfield, UK 等厂家提供),这些离心机都可连续操作,能容纳几十公斤离子交换剂。

2.7 切线流过滤作用

离心是除去细胞碎片和蛋白质沉淀普遍采用的方法,但它不能用于大规模,因此人们在研究各种分离技术。过滤在许多工业上用来进行固液分离,但也不能很好地用于澄清细菌或动物匀浆液,或除去蛋白质沉淀。这些物质本身常呈胶体状或粘液状,除非使用大量的助滤剂,或调节沉淀条件使其产生絮凝沉淀,否则过滤非常麻烦。

防止过滤膜堵塞的方法之一是用切线流过滤。液流垂直于过滤方向,用足够高的流速可使堵塞降到最低。已在小规模使用中证实用这种方法从培养液中去除细菌细胞的效果(Valeri 等, 1979; Tanny 等, 1980)。Quirk 和 Woodrow (1983) 用 Millipore Pellicon 盒式系统证明切线流过滤法对两种细菌抽提液的澄清是可行的。这两种细菌是含芳基酰胺酶的荧光假单胞菌 (Hammond 等, 1983) 和含羧肽酶 G₂ 的假单胞菌 (Baird 等, 1976)。这些结果表明,菌种和细胞破碎方法对过滤速率有明显影响。此外,各向同性膜极易被蛋白质和细胞碎片以及生成的次生膜所堵塞。

用稀释抽提液和清洗膜的方法可以提高酶的回收率。但这些步骤会使体积显著增大。

最近 Domnick Hunter Filters Ltd. (Birtlry, Co. Durham. UK) 已向市场推出具有不对称结构 (Asypore™) 的新型膜。这些膜不大会壅塞,因此可承受很高的固形物浓度。

用总膜面积为 128cm^2 的组件研究了压力、进料速度、膜结构对荧光假单胞菌芳基酰胺酶抽提液过滤的影响 (Le 等, 1984a)。还用菊欧文氏菌在较大规模上验证了这种膜的性能。

用 1m^2 的膜组件从 100 升的培养液中收集细胞 (在 2.5 小时内), 浓缩液中的固形物浓度从原来的 0.55% 增加到 22% (干重计)。此后, 又用这种膜组件澄清由碱溶解细菌后所产生的抽提液 (Le 等, 1984b)。

作者估计, 在 2.5 小时内从 500 升培养液中收集细菌细胞大约需要面积为 7.5m^2 的膜。和离心法相比, 膜过滤工艺的经济效益是明显的。成本大约要比离心法低 25%。此外, 当使用病原菌或基因工程菌时, 有效地消除气溶胶的发生可能是一个需要考虑的重要问题。

2.8 浓 缩

2.8.1 超滤

可采用的超滤装置有四种基本类型, 即搅拌室式、浅道式系统、套筒膜式和中空纤维。

搅拌室

搅拌室由圆筒形容器和装在坚固支架上的超滤膜构成的底座组成。此装置能加压, 用磁力搅拌搅动内容物以防止膜上的浓度极化。这类装置的处理能力从几毫升到 2 升左右 (Amicon Ltd., Stonehouse, Gloucestershire, UK; chem. Lab. Ltd., Ilford, Essex, UK; 和 Millipore, Harrow, Middlesex, UK)。虽然它不适于大规模操作中使用, 但对于预备试验以及柱洗脱液的浓缩还是有用的。

浅道系统

这个系统也采用夹在“压滤机”装置中的许多平膜来进行超滤。待浓缩的流体物料通过用于产生层流的窄道而穿过膜,这样就降低了浓度极化作用。通常都将浓缩液从贮罐流出进行再循环。为增加超滤速率,可对全系统加压。从“压滤机”中流出的超滤液可分别收集。

Amicon, Sartorius, Gottingen, West Germany 和 Millipore 等厂家制造的这类装置都可采用。Linko 等(1973)曾在浅道系统中把 Amicon, Millipore 和 Sartorius 制造的膜和他们自己制造的醋酸纤维素膜作性能比较。

这类装置的处理能力大约 20 升左右,如果备有附加的贮罐,处理能力还可增加。用新鲜缓冲液代替超滤液,附加罐就可以用于透析。

通过浅道时溶液运动会产生高剪切力,因此有人提出异议,认为浅道超滤可能使某些酶遭到破坏(Charm 和 Matteo, 1971)。有一些细菌酶类,如 L-天冬酰胺酶、几种青霉素酶和细胞色素氧化酶不受影响,而依赖 DNA 的 RNA 聚合酶的活性明显损失。因此必须判断某种酶是否可以用这种方法。

浓缩速率变化很大,主要取决于蛋白质浓度、盐浓度、使用的压力、材料性质及所用膜的数目等因素。因此,要作出有效的比较是极端困难的,只能尽力向使用者建议,让他们自己对所采用的系统作出评价。

这种系统的主要缺点是,装配和清洗非常费时间,但是在浓缩的最后阶段,使容积从 10—20 升降至 1—2 升左右,这种装置却是非常有用的。

套筒膜

为得到较大的表面积而又不致做成大而笨重的书架式的一叠平板膜,一个有效的方法是将膜模塑成膜管,然后将这些膜管组装成套筒,液体循环通过套筒,而超滤作用所需要的足够的压力可以通过限制套筒的出口流速来获得。在有些系统中,也可将膜模塑在有凹槽的塑料杆上以产生浅道效应,这就使人联想到,在减小浓度极化作用上,它比中空膜管更有效。

筒系统已用在膜面积达几平方英尺* 的各种大规模装置中。这种系统的制造厂家包括 Amico, Babcock 和 Milcox, P. C. I. Ltd, Whitchurch, Hampshire, UK; Romicon Inc., Rotterdam, The Netherlands.

截留分子量范围从 500—300 000。

中空纤维

它们是直径约为 0.2—1.1 mm 而长度可变的微管膜,可装配在套筒中以利操作,在较小容量的装置中可提供较大的膜面积。

Amicon 生产一种具有 830cm^2 膜面积的实验室用 CH_2 型浓缩器。中空纤维筒可用在截留分子量为 1 000—100 000 的超滤中,纤维的直径是 0.2—1.1mm。直径 0.5 或 1.1mm 的较大纤维管一般适用于蛋白质溶液的超滤,标准的超滤速率每小时达 1—2 升。

也可用较大型的浓缩器, Amicon DC 30 EM 就采用 0.45m^2 表面积的套筒,并且可装上 3—7 个这样的套筒。标准的分子量截留范围是 1 000—100 000。这种类型的浓缩器

* 1 英尺 = 0.3048m。——译者注

最适用于中间规模的工厂,典型的超滤速率每小时可达 50—100 升。Amicon 还特为较大规模生产设计了一种使用 27m^2 面积套筒的 DC 120 EM 型浓缩器,超滤速率每小时达 600 升。

除浓缩外,超滤可以通过浓缩、稀释、浓缩的步骤或用新鲜缓冲液连续替代超滤的方法,用于蛋白质溶液的快速脱盐。

2.8.2 透析

用可截留分子量在 5 000 以上的透析袋来透析蛋白质溶液,这个方法曾作为一个浓缩步骤在实验室已沿用多年,透析管外的液体是由聚乙二醇这样的惰性高分子溶质的水溶液组成。这种方法有可能用于大规模操作,但并不实用,而且昂贵。甚至只脱盐不浓缩的简单过程大概也只适用于几升规模。几升容积的透析已不适用了,对于 10—50 升的容积就完全不实用了。

10—50 升规模的透析(脱盐或缓冲液交换)可用凝胶过滤或超滤。一种尽管较慢但是较廉价的方法,是人工肾透析筒。在 $0.6\text{—}2.5\text{m}^2$ 表面积范围内用起来很方便(例如, C-D Medical Systems Ltd, Slough, Berkshire, UK),只需要两个泵,一个用来通过纤维管泵入蛋白质溶液,另一个用来在纤维管外面循环缓冲液。这种组装操作简单、可靠,若使用适当大小的贮槽,在一夜间能为 20 升蛋白质溶液脱盐。

2.9 层析

2.9.1 层析柱

小规模柱层析技术的原理在别的文章已作过详细叙述(例如, Fischer, 1969; Peterson, 1971),这些原理在大规模

层析中也同样重要 (Janson 和 Hedman, 1982)。柱填充物的上方和下方的无效体积应尽可能小, 设计出的末端床底片应能确保填充物均匀分布在整個柱表面积, 而这些柱的横截面可达 1m^2 , 有的甚至更大。

习用的玻璃或塑料构建的大规模层析柱可以用 Amicon-Wright Ltd (Stonehouse, Gloucestershire, UK) 和 Pharmacia Finechemicals Ltd 提供的产品。这两个厂家都提供需要使用软凝胶的某些应用中所采用的短分段装填柱。Pharmacia 的填充柱直径 37cm, 容积 16 升, 多达 10 个柱连接成一套, 柱总容量达 160 升, 单柱的流动特性大多数只有此套柱能力的十分之一。

Amicon-Wright 制造的一系列分段装填柱, 直径从 18—44cm, 容量从 4.6—30 升。这些柱的特性是, 它可以调整柱末端的床底片以补偿柱床高度的变化。和 Pharmacia 的柱系统一样, 也可以用多至 10 个柱连成一套。这种分段装填柱对生产环境很有利, 如果某一段污染或壅塞了, 可以很快去掉, 并且可以在不严重影响柱正常运转的条件下更换。

这两个厂家还提供不锈钢柱, Pharmacia 提供的柱容量范围是 75—500 升。Amicon-Wright 的是 39—1100 升。不锈钢柱的缺点是不透明。也有许多优点, 在工业生产条件下强度好、易清洗和便于灭菌。Amicon 也推出一批高效能不锈钢柱, 11 升以内的柱子可承受高达 $200\text{kg}/\text{cm}^2$ 的压力, 当然, 柱子越大, 最大操作压力越低。

装填这样的大柱在操作时务必小心, 以避免不同大小的颗粒在凝胶床中分层或中间含有空穴。Pharmacia 对大柱的装填方法作了详细说明, 通常还提到原地溶胀干凝胶的方法。然而, 刚性较好的较新型的柱层析介质是以含水形式出售的, 这对装填的要求就低得多, 的确在许多情况下, 在柱顶稍加压

就可很快把柱装填好。

大规模的柱可以在重力流动下运行，但是用泵进料常常更容易和更方便，尤其在盐梯度洗脱时更是如此。在我们实验室里，通常使用 Watson Marlow 公司 (Falmouth, UK) 制造的滚柱式蠕动泵，这些泵的流速范围可高达 800 升每小时，这样可适用于大部分层析柱。也可选用叶片旋转泵或离心泵。Janson 和 Hedman (1982) 曾讨论过大规模层析用泵的选型问题。

大规模梯度液生成装置可以用一对一样的所需容量的塑料罐或不锈钢罐组成，底部用管子连接，或者用虹吸管连接，用装在上面的搅拌器搅拌原缓冲液罐。用这种简单的设备可以制备多达几百升的线性浓度梯度液。

2.9.2 凝胶层析

凝胶层析材料主要由三家厂商供应，即 Pharmacia Fine Chemicals Ltd, LKB Instruments Ltd 和 Bio-Rad Laboratories Ltd. 他们可提供有关凝胶层析的完整资料。Sephadex (葡聚糖) 和 Bio-Gel P (聚丙烯酰胺) 凝胶系列是众所周知的，它们用于许多酶的大规模提纯，而且可用的孔径和颗粒的大小范围很宽(表 2.2, 2.3)。然而，这类凝胶会随孔径的增加而变软，以致对分子量大于 70000 的蛋白质进行分离的凝胶显得太软而不能在大规模层析中使用。但它们却是脱盐操作的佼佼者。琼脂糖凝胶是有较高硬度的惯用凝胶，它们比葡聚糖或聚丙烯酰胺凝胶的孔径更大(表 2.4, 2.5)，因而它们适于分离大的蛋白质、DNA、RNA 和病毒。

遗憾的是，琼脂糖凝胶在化学上和物理上是不稳定的，因此它不易灭菌或不能用强变性溶剂，在 pH 低于 4 或高于 9 时，或温度在 40°C 以上都不能使用。用二溴丙醇交联琼脂糖

表 2.2 各种 Sephadex 的特性

葡 聚 糖 型 号	干珠直径 (μm)	分离范围(道尔顿)		床 体 积 ml/g 干凝胶
		肽和球蛋白	葡 聚 糖	
Sephadex G10	40—120	—700	—700	2—3
Sephadex G15	40—120	—1500	—1500	2.5—3.5
Sephadex G25	100—300	1000—5000	100—5000	4—6
粗的	50—150			
中等的	20—80			
细的	10—40			
Sephadex G50	100—300	1500—30000	500—10000	9—11
粗的	50—150			
中等的	10—40			
超细的	40—120	3000—80000	1000—50000	12—15
Sephadex G75	10—40	3000—70000		
超细的	40—120	4000—150000	1000—100000	15—20
Sephadex G100	10—40	4000—100000		
超细的	40—120	5000—300000	1000—150000	20—30
Sephadex G150	10—40	5000—150000		18—22
超细的	40—120	5000—600000	1000—200000	30—40
Sephadex	10—40	5000—250000		20—25
超细的				

表 2.3 珠状的聚丙烯酰胺凝胶层析介质聚丙烯酰胺 P(Bio-Gel)
系列的特性 (蒙 Bio-Rad 公司同意)

产 品	水合珠直径 (μm)	分离范围 (道尔顿)	床体积 ml/g 干凝胶
Bio-Gel P-6DG 脱盐胶	90—180	1 000—6 000	7
Bio-Gel P-2 细的	40—80	100—1 800	3.5
	超细的	<40	
Bio-Gel P-4 粗的	150—300	8 00—4 000	5
	中等的	80—150	
	细的	40—80	
	超细的	<40	
Bio-Gel P-6 粗的	150—300	1 000—6 000	7
	中等的	80—150	
	细的	40—80	
	超细的	<40	
Bio-Gel P-10 粗的	150—300	1 500—20 000	9
	中等的	80—150	
	细的	40—80	
	超细的	<40	
Bio-Gel P-30 粗的	150—300	2 500—40 000	11
	细的	80—150	
	超细的	<80	
Bio-Gel P-60 粗的	150—300	3 000—60 000	14
	细的	80—150	
	超细的	<80	
Bio-Gel P-100 粗的	150—300	5 000—100 000	15
	细的	80—150	
	超细的	<80	
Bio-Gel P-150 粗的	150—300	15 000—150 000	18
	细的	80—150	
	超细的	<80	
Bio-Gel P-200 粗的	150—300	10 000—200 000	25
	超细的	<80	
Bio-Gel P-300 粗的	150—300	60 000—400 000	30
	细的	80—150	
	超细的	<80	

表 2.4 珠状琼脂糖层析介质聚丙烯酰胺 (Bio-Gel A)
系列的特性 (蒙 Bio-Rad 公司的同意)

产 品	水合珠直径 (μm)	分离范围 (道尔顿)	凝胶中琼 脂糖的%
Bio-Gel A-0.5m 粗的	150—300	< 10 000 到 500 000	10
	80—150		
	40—80		
Bio-Gel A-1.5m 粗的	150—300	< 10 000 到 1 500 000	8
	80—150		
	40—80		
Bio-Gel A-5m 粗的	150—300	10 000 到 5 000 000	6
	80—150		
	40—80		
Bio-Gel A-15m 粗的	150—300	40 000 到 15 000 000	4
	80—150		
	40—80		
Bio-Gel A-50m 粗的	150—300	100 000 到 50 000 000	2
	80—150		
Bio-Gel A-150m 粗的	150—300	1 000 000 到 150 000 000	1
	80—150		

凝胶可以制备出珠状的交联琼脂糖, 它保留着琼脂糖原有的微孔结构, 并有较好的化学稳定性和热稳定性(表 2.5)。这样的凝胶除最强的变性溶剂外, 可以说在所有的溶剂中都是稳定的。它可以用高压消毒锅反复消毒。

最近几年推出了两种用于蛋白质层析的新材料, 它们都是合成的凝胶材料, 比惯用的介质硬得多。Sephacryl 是用 N, N-甲叉双丙烯酰胺和葡聚糖相交联制备而成的, 表 2.6 给出了这种凝胶的特性范围。最大孔径的 Sephacryl 适用于细胞的层析分离。Uhrogel 是一种聚丙烯酰胺-琼脂糖混合物, 正如表 2.7 所表示的, 它适用的孔径范围较宽, 并显示出有用的层析特性和中等程度的稳定性。Trisacryl GF 05 是一种

表 2.5 琼脂糖凝胶的特性 [蒙 Pharmacia (GB) 公司同意]

Sephacrose 型号	琼脂糖 浓度 (%)	湿珠直径 (μm)	分 离 范 围	
			蛋 白 质	多 糖
Sephacrose 2B	2	60—200	7×10^4 — 40×10^6	20^3 — 20×10^6
Sephacrose CL-2B	2	60—200	7×10^4 — 40×10^6	10^3 — 20×10^6
Sephacrose 4B	4	60—140	6×10^4 — 20×10^6	3×10^4 — 5×10^6
Sephacrose CL-4B	4	60—140	6×10^4 — 20×10^6	3×10^4 — 5×10^6
Sephacrose 6B	6	45—165	10^4 — 4×10^6	10^4 — 10^6
Sephacrose CL-6B	6	45—165	10^4 — 4×10^6	10^4 — 10^6

为大规模脱盐操作设计的全合成凝胶，它显示出极大的化学和物理稳定性。

所有这些可采用的新材料颗粒大小都可和惯用的最细级的凝胶相匹敌。因此，它们显示出较高的分辨率，从而使之能在许多情况下用作获得较高流速和较高产率的替用介质。

这种新型的层析材料都是以在水中已溶胀好的悬浮液形式提供的，因而，除了用规定的缓冲液平衡外不需要预处理。而像 Sephadex 和 Bio-Gel 凝胶这些较老型号的介质都是以干粉的形式提供的，对这些材料进行有效的预处理是保证满意的流速所不可少的。

这些凝胶能够在室温下于所需的溶剂中溶胀，也可用煮沸溶胀。Pharmacia 公司发表了 Sephadex G 的预处理时间表(表 2.8)。煮沸预处理的优点是花费时间最少，同时还去掉了凝胶中的空气。我们发现，类似的条件也可适用 Bio-Gel P 系列的预处理。

预处理过的凝胶，在选用的操作温度下进行平衡后即可

表 2.6 凝胶层析介质 Sephacryl 的特性

[蒙 Pharmacia (GB) 公司的同意]

Sephacryl 型号	湿珠直径 (μm)	分 离 范 围	
		蛋白质	多 糖
Sephacryl S-200	40—105	5×10^3 — 2.5×10^5	1×10^3 — 8×10^4
Sephacryl S-300	40—105	1×10^4 — 1.5×10^6	2×10^3 — 4×10^5
Sephacryl S-400	40—105	3×10^4 — 8×10^6	1×10^4 — 2×10^6
Sephacryl S-500	40—105	—	4×10^4 — 20×10^6
Sephacryl S-1000	40—105	—	5×10^5 — $< 10^8$

表 2.7 凝胶层析介质 Ultrogel 和 Trisacryl 系列的特性 (蒙 LKB 仪器公司同意)

凝胶类型	湿珠直径 (μm)	分离范围(道尔顿) 蛋白质	成 分
Ultrogel AcA22	60—140	10^4 — 1.2×10^6	2% 丙烯酰胺 2% 琼脂糖
Ultrogel AcA34	60—140	20×10^3 — 350×10^3	3% 丙烯酰胺 2% 琼脂糖
Ultrogel AcA44	60—140	10×10^3 — 130×10^3	4% 丙烯酰胺 4% 琼脂糖
Ultrogel AcA54	60—140	5×10^3 — 70×10^3	5% 丙烯酰胺 4% 琼脂糖
Ultrogel Aca202	60—140	1×10^3 — 20×10^3	20% 丙烯酰胺 2% 琼脂糖
Trisacryl GF05	40—80	300—2 000	合成的聚合物
Ultrogel A2	60—140	12×10^4 — 25×10^6	2% 琼脂糖
Ultrogel A4	60—140	5.5×10^4 — 9×10^6	4% 琼脂糖
Ultrogel A6	60—140	2.5×10^4 — 2.4×10^6	6% 琼脂糖

装柱,凝胶是以相当稠的浆灌注入柱的(约为柱体积的 50—75%),静置沉积数分钟。用玻璃棒或塑料棒搅动一下,赶走空气气泡,然后向柱床注入缓冲液。为了使柱趋于稳定,大约要用 3 倍柱床体积的平衡缓冲液流过层析柱。实际上,当操

作制备柱时, 常用 1 倍柱体积的平衡缓冲液就足够了。不应忘记检查柱床的均一性, 这通常是使一种带色物质(如蓝色葡聚糖)流过柱来检验, 因为要设法从装填不良的柱中挽回几克酶, 不但难于做到, 而且代价高昂。

尤其重要的是, 用软的大孔凝胶时柱不要太长, 水压不要太高, 否则, 由于柱床的压缩而可能引起流速严重下降。因此, 用几个柱联成一个系列在某些情况下可以解决这个问题。

表 2.8 Sephadex 的预处理条件
[蒙 Pharmacia (GB) 公司同意]

Sephadex 型号	最少溶胀时间	
	在室温下	在沸水浴上
G-10, G-15, G-25, G-50	3 小时	1 小时
G-75	24 小时	3 小时
G-100, G-150, G-200	3 天	5 小时
LH-20	3 小时	—

由于新型的较硬的层析材料, 如 Sephacryl, Sepharose CL 和 Ultrogel 等能经受较大的操作压力, 因此在略高于最终使用流速的稳定流动条件下, 可有效地装填柱。这样可获得比只用重力流动更均匀的填充柱床。

洗脱液的流速最好用泵来保持, 许多类型的泵都可使用, 实验室的层析柱通常用蠕动泵, 这些泵可供使用的大小范围很宽, 能适应大柱的需要。对大型蠕动泵来说, 管子磨损可能是一个关键因素, 必须密切地注视管子的情况, 或者可按定好的日程表定期更换。

蠕动泵的优点是, 液体只接触管子, 因此容易保持液体的洁净和无菌。

不锈钢叶轮泵和齿轮泵或者离心泵都可采用, 但必须谨

慎地选型,以保证润滑剂或金属碎屑不致进入柱中,而且要选用容易清洗的型号。

最好是用泵或专为进样而设计的二级泵来进样。必须注意的是,要防止气泡进入柱中。而要做到这一点,可在柱的进口处装一个三通阀,并在缓冲液泵一侧阀上联上一个气泡截留器。

大层析柱的分部洗出液可达数升容积,直到最近这些部分的收集都还存在问题。柱在低流速下运转时,人工换管的办法是可行,如果是 24 小时轮班操作就更没有问题。最近几年,推出了许多部分收集器,它们几乎能把任何大小的部分收集进任何容器中。它们是 Pharmacia 制造的 PF30 或 FRAC 300 部分收集器, LKB 制造的 Multi-Rac 或 Super-Rac 部分收集器。这些收集器有不同的精密程度和可控性能,非常有助于大层析柱的运转。

监测柱中洗脱液的流动是同样重要的,蛋白质紫外检测仪是常用的仪器,它可以在高流速下工作,其他可用的检测仪有 pH 检测仪、导电率检测仪、流速检测仪和压力检测仪。层析系统的精细检测和自动控制,在小规模操作中一般是不需要的,但是在大规模操作中,特别是在工业规模的操作中,由于产品价值的原因,往往必须检测和自动控制。尽管许多情况下实验室可以制作适合的设备,但是一些控制和监测设备还是用 Pharmacia 的。这样,就有可能形成一个完全自动的、连续操作的层析系统,这个系统包括进料、部分收集和柱再生,还有自动防止故障的装置以保护柱,例如用于防止产物出现渗漏的装置。

2.9.3 离子交换层析

可用来大规模纯化酶的离子交换剂有三种类型,它们是

离子交换树脂、离子交换纤维素和离子交换大孔凝胶。

装成柱时,由于离子交换树脂的稳定性好、易沉积和高孔率,因此对于酶的大规模纯化来说,离子交换树脂更显示其有用的特性。然而,当酶在具有高电荷密度的基质附近时,其结构的完整性可能受到不可逆的影响,例如,用离子交换树脂的情况就是如此,那里会发生蛋白质高度结合。而且因有高度交联的疏水基质,蛋白质结合只限于树脂颗粒的表面。正如前面所指出的那样,在酶稳定性许可的酶纯化中,树脂会有一些用途。

尽管用离子交换纤维素大柱来进行大规模操作遇到过困难,但它仍能用在柱式或批式工艺中。纤维素容易压缩,很快会导致流速降低,因此在大规模提纯中,离子交换纤维素将主要应用于批式吸附和批式洗脱。

表 2.9 某些工业上通用的纤维素离子交换剂的性质

离子交换剂	总容量 (meq/g)	可用容量 (mg/g)	物理形状
Cellex D ^a	0.4	—	纤维状
	0.7	—	纤维状
	0.9	—	纤维状
Whatman DE23 ^b	1.0	450 (白蛋白) ^d	纤维状
Whatman DE51 ^b	0.22	150 (白蛋白) ^d	微粒状
Whatman DE52/(32) ^b	1.0	660 (白蛋白) ^d	微粒状
Whatman DE53 ^b	2.0	800 (白蛋白) ^d	微粒状
DEAE-Sephacel ^c	1.4	160mg/ml (白蛋白) ^e	珠 状
Cellex CM ^a	0.7		纤维状
Whatman CM23 ^b	0.6	150 (γ 球蛋白) ^f	纤维状
Whatman CM52/(32)	1.0	400 (γ 球蛋白) ^f	微粒状

a. 由 Bio-Rad Laboratories Ltd 生产; b. 由 whatman chemical separation Ltd 生产; c. 由 pharmacia Fine chemicals Ltd 生产; d. 在 0.005mol/L 的磷酸缓冲液中测定 (pH8.5); e. 是在 0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液中测定 (pH8.0); f. 是在 0.08mol/L 的磷酸缓冲液中测定 (pH3.5)。

表 2.9 给出了通用的离子交换纤维素的细目。

有几个影响酶批式制备吸附能力的因素。假定离子强度、pH 以及离子交换纤维素的制备等条件适当,另一个重要的参数就是实现工艺过程的容器。维持合适的温度也是基本的,因而需要一个接有冷却水的钢夹套容器或带有冷却盘管的塑料罐。维持纤维素成悬浮状态的方法限于机械搅拌和喷入压缩空气。在 10—20 分钟内,大部分酶将吸附到交换剂上,但是根据我们的经验,其余部分需要 24 小时方能吸附上,搅拌是其余部分酶吸附的关键。

机械搅拌是最简便的方法。如果用密闭的容器,在好气,甚至在厌气的条件下都能进行操作。如果进行强搅拌,就会出现产生微粒的严重问题,对此可以装上变速马达,通过降低搅拌速度使纤维素保持悬浮状态,不致过度产生微粒,从而克服上述问题。

经适当时间沉淀后,用虹吸或泵除去上清液,就能够回收离子交换纤维素。沉淀的浆最终经容器底部的阀门收集。惯用的布氏漏斗加滤纸从浆中除去残留的溶液比较麻烦,而用装有致密的棉布袋的篮式离心机(见前面)可以圆满地解决上述难过滤的问题。篮式离心机也可以用于洗脱工艺过程。

离子交换纤维再生是简便的。用布氏漏斗和过滤器时,2kg 纤维素需用 2 天时间进行再生,而用上面介绍的篮式离心机可处理上述 20 倍量的纤维素。阴离子交换剂的再生过程是将它悬浮在 0.5mol/L 的盐酸中,当 pH 降到 2 以下时,除去纤维素,并把它悬浮到 0.5mol/L 的氢氧化钠中,控制 pH 在 12 以上。阳离子交换剂的再生过程正好和上面相反。将纤维素在水中洗涤几次以除去再生时形成的盐。把纤维素单独悬浮在浓缓冲液进行充分的平衡,随后用最终平衡缓冲液洗涤几次,并检查是否达到所需的 pH 和电导率。一般常在

交换剂经几次吸附和再生后,才能得到可重复的再生结果。

例如从培养上清液中吸附胞外酶时可用少量的纤维素,这种情况正如上面所述,尽管纤维素可以收集,但用收集的纤维素装柱(见上述柱这一节)可能对酶的洗脱更合理。这样可比用批式洗脱所达到的洗脱过程控制得更严格。

Sephadex 离子交换剂(表 2.10),尤其是以 Sephadex G50 为基础的离子交换剂,由于它们的硬度低,且往往随缓冲液的离子强度和 pH 的变化而收缩或膨胀,因此不太适用于大规模层析。以 Sephadex G25 为基础的离子交换剂的硬度要好得多,但由于蛋白质的结合只限于珠的表面,因此对大多数蛋白质来说,它并不表现出很大的结合容量。

对于大规模离子交换层析,理想的材料是较新型的以交联的琼脂糖或 Trisacryl 为基础的离子交换剂(表 2.11)。它们都呈现出极好的流速和结合容量,不随离子强度和 pH 的变化而出现体积变化,它们在装置内再生省劳力,从而能进行半连续自动化操作。Pharmacia 最近推出了许多离子交换用

表 2.10 Sephadex 离子交换剂的性质

[蒙 Pharmacia (GB) 公司同意]

离子交换剂		总容量 (meq/100ml)	对血红蛋白 结合容量 (g/100ml)	极限分子量
DEAE-Sephadex	A-25	50	7	3.5×10^4
	A-50	17.5	25	0.5×10^5
QAE-Sephadex	A-25	50	5	3.5×10^4
	A-50	10	20	2.5×10^5
CM-Sephadex	C-25	56	5	3.5×10^4
	C-50	17	35	2.5×10^5
Sp-Sephadex	C-25	30	3	3.5×10^4
	C-50	9	27	2.5×10^5

Sephacrose, 称之为“速流型”(“fast flow”), 是专为大规模离子交换层析而开发的产品。

表 2.11 以 Sepharose CL-6B 和 Trisacryl M 为基础的
离子交换剂的性质。

[蒙 Pharmacia (GB) 公司和 LKB 仪器 公司同意]

离子交换剂	珠的大小 (μm)	蛋白质分子量的排除极限	总容量 ($\text{meq}/100\text{ml}$)	对血红蛋白结合容量 ($\text{g}/100\text{ml}$)
DEAE-Sepharose CL-6B	45—165	10^6	15 ± 2	10
DEAE-Trisacryl M	40—80	10^7	30	8—9
CM-Sepharose CL-6B	45—165	10^6	12 ± 2	10
CM-Trisacryl M	40—80	10^7	20	9—10

2.10 亲和层析

正如 A 部分第 2 章所讨论过的, 亲和层析并不广泛用于大规模酶纯化。当采用亲和层析时, 使用者选用活化的载体制备出它自己的亲和基质, 然后用已活化好的基质或用已制备好的亲和基质和配基反应。

正像表 2.12 所示, 层析介质的多数供应厂家制备出一系列适用于与亲和配基相偶联的活化载体, 同样, 他们也制备一系列包括染料、外源凝集素、多核苷酸、核苷酸辅因子、蛋白质 A、苯基硼酸、肝素、明胶、抗生蛋白、钙调蛋白 (calmodulin) 和吩噻嗪在内的固定化配体。

这些制备好的网格和与此偶联的配体通常只有少量可供使用, 在许多情况下, 需要量大的使用者常常没有选择余地, 只好自己合成。最近已经认识到了对某些亲和基质的大量需

表 2.12 某些工业上可用的活化亲和凝胶的性质
(承蒙 Pharmacia 精细化学药品公司, LKB 仪器公司和 Bio-Rad 公司的同意)

亲和基质	活化剂、间隔臂和功能基团	配基特异性
CNBr Sepharose 4B	CNBr	-NH ₂
AH Sepharose 4B	己撑二胺	-COOH
CH Sepharose 4B	6-氨基己酸	-NH ₂
活化的 CH Sepharose 4B	6-氨基己酸的羟基 丁二酰胺脂	-NH ₂
环氧活化的 Sepharose 6B	1, 4 双 2, 3-环氧丙氧基丁烷 [1,4-Bis-(2,3-epoxypropoxy) butane]	-NH ₂ , -OH, -SH
活化硫解 Sepharose 4B	谷胱甘肽-2-吡啶基二硫酸盐	-SH, -C=O, -N=N, 氨基或芳基卤
活化的 Ultrogel AcA22	戊二醛	-NH ₂
AC-Ultrogel AcA 34	H ₂ N-NH ₂ 6-氨基己酸	-NH ₂
亲和凝胶 10 (Affi-Gel10)	在 10 个原子亲水间隔臂上的 N-羟基丁二酰脂	-NH ₂
亲和凝胶 15 (Affi-Gel15)	在 15 个原子亲水间隔臂上的 N-羟基丁二酰脂	-NH ₂
亲和凝胶 102(Affi-Gel102)	在 6 个原子亲水间隔臂上的 NH ₂	-NH ₂
亲和凝胶 202(Affi-Gel202)	在 10 个原子亲水间隔臂上的 COOH	-COOH
氨基乙基 Bio-Gel P ₂ 或 P150	二氨基乙烷	-NH ₂
CM Bio-GelA	羧甲基	-COOH

要,有可能从某些厂家取得某些大量亲和基质产品。

在 A 部分第 2 章以及最近 Hill 等 (1983) 和 Janson (1984) 写的两篇综述中,列出了亲和层析大规模应用的例子。

第3章 酶的工业应用

P. J. 奇塔姆

术 语 词 汇 表

7ACA	7-氨基头孢烷酸
7ADCA	7-氨基3-脱乙酰氧基头孢烷酸
6APA	6-氨基青霉烷酸
BOD	生物需氧量
DE	右旋糖当量
DEAE 纤维素	二乙基氨基乙基纤维素
DNA	脱氧核糖核酸
DNP	2,4-二硝基苯酚
HFCS	高果糖浆(异葡萄糖浆)
NAD	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
NADP	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
RNA	核糖核酸

3.1 引 言

酶的工业应用并非新事物。许多原理了解得并不完全清楚的传统工艺被发展,有时甚至沿用数千年以上的传统工艺。这些工艺通常具有这样的特点,即发展速度极其缓慢,它们往往达不到像化学工业那样充满活力,并不断进行革新的工业

那样采纳最新科技进展的程度。这些工艺还通过各自独特的优点解决生物技术所固有的经济问题。这些问题是由下面的一些因素造成的：生成物的水溶液浓度低，产物不稳定，以及产生包括未用掉的底物和副产物在内的复杂的反应混合物，而所需要的产物又不得不从这样的反应混合物中回收并浓缩。现有生物技术独到的优点，包括啤酒、干酪、面包所具有的优异的风味和营养价值；污水处理中相互作用的微生物群体的异乎寻常的活性；抗生素小批量高产值等。然而，在近几十年中，我们已掌握了有关酶和微生物生物催化能力的新知识，就有可能推出经过合理研究和开发的以生物为基础的新一代工艺和产品。

目前，大部分工业酶用在食品加工中，例如工业上最常用的4种酶中的3种（ α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶和葡萄糖异构酶）用于葡萄糖和果糖浆的生产。强调这一点是毫不奇怪的，因为大多数食物是天然产物，是动植物和微生物的酶合成的。此外，酶存在于许多食物中并起作用，例如贮存过的肉，由于酶尤其是溶酶体蛋白酶（组织蛋白酶）和胶原酶的作用，变得柔嫩；在我们的消化道中，用酶来分解摄入的食物。发达的工业化国家制造出的产品中估计有40%是生物的或来源于生物的，由此可见，今后酶的工业用途完全有可能增加（Dunnill, 1981）。

本章将向读者介绍酶在工业和其他方面应用的一般原理和概念，并列出了有关使用的典型实例。多数情况下，包括使用与可溶酶存在形式不同的酶，即仍与产酶细胞相连接着的酶。在这样的篇幅中，不可能作全面深入的综述，而且不能收集到全部技术的详细情况，更难于取得具有工业生产价值或工业生产前景的生产工艺的细 节。虽然在科学论文和（或）专利文献中记述了许多实验室过程和略少一些的中试工厂过程，但

是很难辨别出这些过程的工业化生产价值。

生物技术的定义是应用科学原理和工程原理，特别是微生物学、生物化学、遗传学、生物化学工程学和化学工程学等学科的原理，通过生物的作用加工材料以提供产品和服务(Bull 等, 1982)。酶常常用于工艺改进，例如能利用新类型的原料或用于改进原料的物理性质以利于加工，也可采用增加原料的溶解度和降低粘度的方式使加工过程容易过滤或泵送。其次，酶还用于提高产品质量，如改变食品的色泽、香味、组织、风味或货架寿命，以便更受零售商或消费者的欢迎。

酶必须能够生产出具有下列某些优点的产品，才是有用的并且才能商品化生产：(1)要比传统产品的质量高；(2)在产品原定的应用中效用提高；(3)较便宜，这当然可以间接做到，如减少制造过程中的劳务和(或)机器的成本；(4)最后，也是最重要的一点，用酶可生产出前所未有的产品或者由于天然来源供应受限而生产量有限的产品。

酶参与的工艺或产品，与同酶工艺竞争的现有工艺或产品相比，其优点可能是很有限的，至少在开始时是这样。例如，用固定化葡萄糖异构酶生产高果糖浆，只是在本世纪 70 年代中蔗糖价格暴涨期间才真正起步。70 年代糖价暴涨是由于飓风和病虫害使蔗糖供应短缺，以及酝酿成立蔗糖生产国卡特尔等原因引起的，其结果却使软饮料等大宗用糖的行业用高果糖浆代用蔗糖，现在每年销售的高果糖浆达数百万吨。

酶法生产的产品主要可以分成三大类：第一类是与传统方法制出的产品相仿的产品；第二类也是与传统产品相仿的产品，但工艺和(或)产品有些不同和(或)改进；第三类则是新产品，这是一些以前无法生产，只是用了酶法后才能生产的产品。

工业化生产中有用的酶并不一定在产生所需化合物的加工过程中起主要作用。但是在许多重要应用过程中酶处理方法是很有用的,在这些应用中,酶处理可提高产品的质量或使产品的生产容易进行,或者应用在合成过程中,用酶法可产生出化学法难以合成的中间产物,而且酶处理常常用于不经任何酶处理用传统方法可成功完成的加工过程中。例如,添加脂肪酶可加快干酪的成熟,使用果胶酶和淀粉酶可降低果汁的粘度以使以后的过滤或絮凝法澄清果汁容易进行。

3.2 酶 的 生 产

如果有可能,使用耐热酶是有好处的,这是由于酶反应在较高温度下进行时反应速度加快,有利于降低底物粘度,增加反应物的溶解度,特别是有助于减少微生物的污染。如果这些耐热酶在常温下使用,通常要比从中温菌株细胞获得的相应的酶稳定得多。

适合于生产酶的微生物应具备一些有益的性质。这些性质包括:在大型发酵罐中用比较廉价和简单的养料,不需添加诱导剂的条件下容易生长,而且生长迅速。此外,还应以下面的形式得到高产量的酶,即酶容易分离纯化和浓缩,而且不形成有毒或致免疫的代谢物。产酶微生物也应具有稳定的生理特性,而且容易得到食品和医药管理机构的批准[见 Barfoed (1981) 的综述]。

用形成突变株的方法,筛选具有某些特性的产酶高产菌株也是可采用的策略。这些突变株由于具有无活性的阻遏物位点,不需添加诱导物;并显出低分解代谢阻遏;无反馈阻遏或产生抗终产物抑制的酶等特性。例如,工业生产中用于脱除柚和柑桔苦味的葡糖苷酶(柚苷酶)是经过精心选择的,

它是对酶作用于味苦类黄酮糖苷所产生的葡萄糖的抑制具有抗性的酶 (Sakaguichi 等, 1971)。实际上, 虽说近年来遗传工程取得了飞速进展, 但经典的酶筛选技术, 尤其在考察产生具有特异性质的酶的微生物细胞所需的新环境和(或)外部环境时仍是很有用的。例如, 从海洋微生物得到一系列氯化酶 (Neildlelman 和 Geigert, 1983); 大黄的病原细菌产生相当量的一种新型糖异麦芽蔗糖的酶 (Cheetham 等, 1982)。最近还有更异乎寻常的发现, 生长在深海火山口的约 250°C 下的微生物一定具有热稳定性超群的酶, 而且发现树木蛀虫的肠道中的一种微生物能降解纤维素, 还能固氮 (Waterburg 等, 1983)。

总之, 目前工业生产中使用的酶, 大多数是微生物来源的, 而且用传统的通气深层发酵法生产, 对生长条件的控制要比固态发酵好得多。人们常对微生物菌株的选择和培养了解得较深透, 而对产酶微生物所进行的酶合成、酶降解、酶分泌等了解得少。这些酶通常是容易分离和纯化的胞外酶。如果不是胞外酶, 就要破碎细胞, 再纯化酶提取物, 并以浓缩液形式提供制剂。也可以把酶沉淀下来, 以混有乳糖等惰性稀料的干粉形式提供制剂。这里特别要指出, 凝结芽孢杆菌葡萄糖异构酶是为数不多的用连续发酵法制造的商品酶之一。

目前遗传工程技术上所取得的迅猛进展已展现出这样的前景, 即有可能很容易生产这样一种酶, 不必考虑酶的催化功能和它的来源, 就能以目前占主要地位的蛋白酶及用于糖和淀粉加工的淀粉酶等少数几种酶同样的数量和售价进行生产。这可通过增加微生物中的基因复制数目, 从而增加产生的酶浓度和酶量或通过菌株间的遗传转移技术来达到。这些技术是原生质融合, 以及不太严格地称为“遗传工程”的技术, 即通过使用限制性内切核酸酶有选择地把 DNA 切成片段,

然后用 DNA 连接酶以不同的组合把这些片段连在一起。这些技术具有的优点是用在特性和系统发育来源差别很大的细胞之间结果很好,而且后代细胞通常不会出现传统的诱变技术存在的、由有害变异积累引起的效能严重低下现象。但是导入的遗传物质的表达不确定性也许是存在的主要问题。酶在宿主微生物中的表达是受许多可变因素影响的,人们对其中某些因子的影响了解得还很不透彻。这些因素包括宿主菌株的选择、核蛋白体结合部位、质粒复制数及酶的 N 末端氨基酸顺序等。例如,研究得比较清楚的宿主之一的大肠杆菌中,外源基因常会导致非天然的不溶蛋白质产物的大量积累。由于遗传工程细胞经常是代谢能力低下的,生长速率要比天然细胞低,看来把它们用作固定化细胞可能会有好处,因为以这种形式使用时,并不需要生长。

Winter 等(1982)已记述了遗传操作技术令人振奋的应用。他们把脂肪嗜热芽孢杆菌的酪氨酰 tRNA 合成酶活性部位的半胱氨酸 35 转成丝氨酸,这是采用把酶的基因克隆到载体上以利于失配的合成寡核苷酸引物引发的诱变。重组体克隆在大肠杆菌宿主中高水平表达出酶,改变了的酶由于对 ATP 的 K_m 较低,活性也较低。这种方法有希望成为采用重新设计现有酶的遗传工程办法得到新型酶活性的通用手段。例如,可得到具有不同底物范围、不同最适 pH 和不同最适温度的酶,而且这些酶会从细胞分泌出来而不是存留在细胞中。在某种程度上,位置专一的修饰将会取代传统的诱变和筛选过程,特别是在缺乏使筛选容易进行的显著特性的情况下尤其适用。然而,这种精确的修饰技术要以了解所研究酶的一级结构与它的活性、稳定性及其他特性间的相互关系为前提,遗憾的是任何工业上重要的酶的这些特性都未经确定,或者说未完全确定。包含启动子区操作的遗传克隆技术可用来增

强某些基因的表达,因此,它们的蛋白质产物能代表细胞蛋白质的相当大的部分。遗传重组的细胞也能够以固定化形式被利用。例如,固定化的带有大白鼠胰岛素原质粒的枯草杆菌,在细胞生长时不进行蛋白质合成或分泌,而是不断产生胰岛素原,这可用加入抑制 DNA 复制的新生霉素等抗生素加以抑制 (Mosbach 等, 1983)。在这项研究中,细胞是被固定在豆油作悬浮介质所形成的琼脂糖珠 (直径 100—300 μm) 中 (Wikström 等, 1982)。

3.3 酶的用途

表 3.1 列出的是工业用酶的历史发展情况。使用最多的是 α -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、葡萄糖异构酶和各种蛋白酶。使用量可观的酶只有 20 种左右,因此整个酶工业只有较低的年成交量,但是有几种酶具有足够的工业生产价值,并且在商品市场上交易。这里还要特别指出,使用吨数极多的麦芽淀粉酶的统计数是靠不住的,因为大多数用的是发芽大麦。与其他工业生产领域一样,有些酶产品的使用增长是很可观的,例如,凝乳酶;而其他一些酶产品则有较稳定的市场,如用于纺织品褪浆和皮革浸水脱毛等加工的淀粉酶和蛋白酶。

现在已有许多种生物来源、活性、纯度、物理形状不同,以及最适 pH 和最适温度等特性不同的、能大批供应的酶。特别是酶生产厂商提供了具有稳定质量和活性的种类相当多的淀粉酶和蛋白酶 (见表 3.2)。这种广泛的选择,在考虑特定的应用时往往是很有用的。例如,酶制剂中掺进其他酶类可能会有好处。这就是说某一种商品化酶制剂与专门的工业应用相联,在需要的时候可专门加工制作,以便更符合这些需要。例如,已有不同用途的含有 α -淀粉酶的各种产品出售,包括

表 3.1 最重要的工业酶类型

来 源	名 称	能大批供应市场的			现在的产量 (每年产的酶 蛋白吨数)
		1900 年前	1950 年前	1976 年前	
动物	粗凝乳酶	×			2
	胰蛋白酶		×		15
	胃蛋白酶		×		5
植物	麦芽淀粉酶	×			10000
	木瓜蛋白酶		×		100
微生物	日本曲	×			?
	芽孢杆菌蛋白酶		×		500
	淀粉葡萄糖苷酶			×	300
	芽孢杆菌 α -淀粉酶		×		300
	葡萄糖异构酶			×	100
	微生物凝乳酶			×	10
	真菌 α -淀粉酶	×			10
	果胶酶		×		10
	真菌蛋白酶	×			10

(Aunstrup, 1977)

米曲霉的不含蛋白酶的 α -淀粉酶用来调节面粉中的糖化程度；细菌蛋白酶和 α -淀粉酶的混合制剂用于饼干的生产； α -淀粉酶制剂用于调节面包和卷饼的糖化程度并能提高面粉中面筋的弹性；另一种含 α -淀粉酶的制剂用于延缓蛋糕、蛋糕预配料、胡桃巧克力小方饼、面包等的陈化和变干，这种制剂加上其他种类的酶一起应用于啤酒酿造、洗涤剂、制药、淀粉加工、造纸、纺织、皮革、葡萄酒和果汁等工业。特别要提到，市场上能买到固定化酶，其中最闻名的是 Novo 制造的葡萄糖异构酶，其他还有胰蛋白酶、脲酶、核糖核酸酶、过氧化物酶、木瓜蛋白酶及其他蛋白酶、淀粉酶、天冬酰胺酶、醇脱氢酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶等。

表 3.2 酶的若干工业应用

酶(俗名)	主要来源	主要应用
丙氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶	枯草芽孢杆菌和博伊丁假丝酵母 (<i>Candida boidinii</i>)	由丙酮酸生成丙氨酸
氨基酰化酶	大肠杆菌	拆分消旋氨基酸混合物
天冬氨酸酶	大肠杆菌	生产天冬氨酸
天冬氨酸脱羧酶	德阿昆哈假单胞菌 (<i>Pseudomonas dacunhae</i>)	生产丙氨酸
细菌 α -淀粉酶 (α -葡聚糖酶)	枯草芽孢杆菌, 地衣形芽孢杆菌, 淀粉液化芽孢杆菌	葡萄糖浆生成过程中预稀化淀粉, 酿啤酒及蒸馏前水解淀粉, 造纸, 纺织, 清洗剂, 制药及动物饲料加工
真菌 α -淀粉酶	米曲霉和黑曲霉	淀粉液化, 水果, 蔬菜, 酿啤酒, 烘烤食品, 糖果加工及造纸
细菌 β -淀粉酶	蜡状芽孢杆菌, 环状芽孢杆菌, 多粘芽孢杆菌以及链霉菌	把淀粉降解成麦芽糖和葡萄糖浆以用于食品及饮料产品, 以及用于乙醇生产
细菌异淀粉酶	蜡状芽孢杆菌	同上
植物 α -淀粉酶和 β -淀粉酶	大麦和大豆	生产应用于啤酒和面包的一系列含有葡萄糖和麦芽糖的麦芽提取物
β -淀粉酶	黑曲霉, 米曲霉和芽孢杆菌	同上

表 3.2 (续)

酶(俗名)	主要来源	主要应用
淀粉葡萄糖苷酶	黑曲霉, 泡盛曲霉, 米曲霉, 雪白根霉, 米根霉, 德氏根霉, 绿色木霉	用预糖化的淀粉生产葡萄糖浆, 用于酿啤酒, 乙醇, 烘烤食品, 纺织, 造纸, 发酵, 制药, 软饮料, 糖果
花色素酶	黑曲霉	红葡萄酒脱色
过氧过氧化氢酶	黑曲霉, 青霉, 溶壁微球菌, 牛肝	在牛奶、干酪和蛋品加工中去除过氧化氢, 亦用于灭菌, 氧化, 发泡和塑料, 橡胶的生产中
纤维素酶	里氏木霉 (<i>Trichoderma reesei</i>), 黑曲霉, 米曲霉, 海枣曲霉, 温特曲霉, 米黑毛霉	果蔬加工
环糊精葡萄糖基转移酶	浸麻芽孢杆菌, 巨大芽孢杆菌	生成环状糊精
葡聚糖酶	产气克雷伯氏菌, 绳状青霉, 淡紫青霉, 镰孢, 黄杆菌	制糖和食品加工中水解多糖
双乙酰还原酶	产气杆菌	去掉啤酒中有异味的双乙酰
环氧琥珀酸水解酶	酒石酸诺卡氏菌 (<i>Nocardia tartaricus</i>)	生成酒石酸
延胡索酸酶	产氮短杆菌	生产苹果酸
α -半乳糖苷酶	黑曲霉, 葡萄酒色被孢霉, 酿酒酵母	炼糖时水解寡糖, 生产豆浆

β -半乳糖苷酶(乳糖酶)	大肠杆菌,芽孢杆菌,黑曲霉,米曲霉,脆壁克霉,伯氏菌,脆壁酵母,乳酸酵母,也称脆壁克鲁维酵母,乳酸克鲁维酵母	水解乳中的乳糖,其他乳品加工中应用,特别是水解乳清中的乳糖,也用于制药
β -葡聚糖酶	枯草芽孢杆菌,环状芽孢杆菌,黑曲霉,米曲霉,埃默森青霉(<i>Penicillium emersonii</i>),酿酒酵母	制啤酒过程中水解多糖,从植物材料提取果汁和其他产品,如调味品
葡糖异构酶	密苏里游动放线菌,凝结芽孢杆菌,白色链霉菌,橄榄色链霉菌,橄榄色产色链霉菌,暗色产色链霉菌,节杆菌	把葡糖异构化成果糖糖浆
葡糖氧化酶	黑曲霉,灰绿青霉,特异青霉,产黄青霉	抗氧化剂,例如用于水果及蛋清的保存;控制葡萄酒的颜色,生成葡萄糖醛
组氨酸解氨酶	无色杆菌(<i>Achrombacter liquidum</i>)	生产尿刊酸
11 α -羟化酶	少根根霉及其他微生物来源	黄体酮 11 α 羟化,合成司的松、氢化司的松、氢化强的松、强的松
菊粉酶	脆壁克鲁维酵母,曲霉和假丝酵母	生成甜味剂
蔗糖酶	脆壁克鲁维酵母,卡尔斯伯酵母,酿酒酵母,假丝酵母	作为生产糖果及湿润剂的转化糖,制啤酒,制人造蜂蜜
异麦芽蔗糖合成酶	大黄欧文氏菌,红色鱼精蛋白杆菌	生成异麦芽蔗糖(Isomaltulose)
脂肪酶/酯酶	黑曲霉,米曲霉,爪哇毛霉,微小毛霉,米黑毛霉,雪白根霉,解脂假丝酵母,圆柱形假丝酵母,小牛、小山羊、小绵羊及猪的胰	皮革和羊毛加工,改良干酪和黃油的香味,油脂改良,废弃物处理

表 3.2 (续)

酶(俗名)	主要来源	主要应用
乳过氧化物酶		牛乳,冷灭菌
脂肪氧合酶	大豆粉	面包增白,氧化植物油
苹果酸脱羧酶	酒明串珠菌	饮料生产
柚苷酶	黑曲霉	柑桔类果汁脱苦味
乳酸链球菌肽酶	蜡状芽孢杆菌	从牛乳中去除乳酸链球菌肽(一种抗生素)
果胶酶/果胶酯酶	黑曲霉,赭曲霉,米曲霉,米根霉,里氏木霉,筒青霉	提取及澄清用于软饮料,啤酒及葡萄酒的果汁,也用于香料和咖啡的提取
青霉素酶	地衣形芽孢杆菌,蜡状芽孢杆菌	去除牛奶中的抗生素
青霉素酰基酶(青霉素酰化酶)	巨大芽孢杆菌,大肠杆菌,担子菌,无色杆菌	生成半合成抗生素所需的6-氨基青霉烷酸
苯丙氨酸解氨酶	酵母	生成苯丙氨酸
肌醇六磷酸酶	无花果曲霉	去除谷物中的肌醇六磷酸
植物蛋白酶(木瓜蛋白酶,无花果蛋白酶,菠萝蛋白酶等)	木瓜,无花果,菠萝	酵母膏生产,防止啤酒冷变浊,烘烤食物,制革,纺织,制药以及包括肉嫩化在内的和动物食品加工
动物蛋白酶(包括胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等)	牛,绵羊,猪	制革和制药工业,食品加工,尤其是水解干酪乳清等蛋白质的蛋白水解,肽合成

微生物蛋白酶	黑曲霉	干酪,肉,鱼,谷物,水果,饮料及烘烤食品工业
微生物蛋白酶	黄曲霉	食品加工
微生物蛋白酶(酸性蛋白酶)(中性蛋白酶)	米曲霉	蛋白质水解,特别是肉和鱼的加工,啤酒酿造,烘烤食品
微生物蛋白酶	蜜蜂曲霉,栗变菌,米黑毛霉,微小毛霉	干酪制造(凝乳)
微生物蛋白酶(碱性蛋白酶)	地衣形芽孢杆菌,枯草芽孢杆菌	洗涤剂及制革工业,肉、鱼及乳品加工
微生物蛋白酶(中性蛋白酶)	枯草杆菌	饮料生产和烘烤食品
微生物蛋白酶	蜡状芽孢杆菌	饮料及烘烤食品
茁霉多糖酶(支链淀粉酶)	产气克雷伯氏菌,芽孢杆菌	葡萄糖浆生成过程中脱除淀粉支链,啤酒酿造
凝乳酶	未断奶的牛犊及绵羊羔的第4胃	干酪制作中凝乳
核糖核酸酶	桔青霉,米曲霉,灰色链霉菌	生成用作调味剂的核苷酸
巯基氧化酶	乳清	减少牛乳的煮熟样味道
羧酸酶	米曲霉,黑曲霉	饮料加工,例如,茶和啤酒
嗜热菌蛋白酶	解蛋白芽孢杆菌	生产高甜度的甜味剂天冬甜精(天冬氨酸-苯丙氨酸甲酯)

表 3.2 (续)

酶(俗名)	主要来源	主要应用
色氨酸酶		色氨酸形成
木聚糖酶	链霉菌, 黑曲霉, 米曲霉, 二型孢侧孢霉	谷物, 茶, 咖啡, 可及巧克力糖加工
以混合物状态使用的酶		
果胶酶, 半纤维素酶, 蛋白酶	曲霉, 根霉, 木霉	水果加工(提取和澄清)
葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶	黑曲霉	作抗氧化剂用, 如用于软饮料、黄油及葡萄酒的生产
淀粉酶, β -葡聚糖酶,	枯草芽孢杆菌	啤酒酿造
蛋白酶, 纤维素酶		
放线菌、无色杆菌、假单胞杆菌所产酶的混合物		细胞溶解制品
蛋白酶, 淀粉酶, 还有脂肪酶	枯草芽孢杆菌	洗涤剂
酶和细菌的混合物		废弃物处理(清洗剂)

在所使用的酶中,约有 60% 是水解蛋白质的酶类,30% 是水解碳水化合物的酶类,使用的总量仍然不大,这是因为通常使用的酶浓度远低于所加工底物重量的 1% (见表 3.1、表 3.2 和图 3.1)。

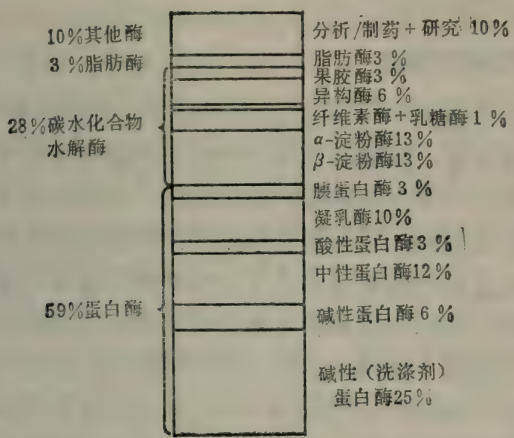


图 3.1 各种工业上重要的酶的相对使用情况(Godfrey 和 Reichelt, 1983)。

大批供应市场的酶可按照效力、价格和纯度分成三类。大规模使用的酶,如葡萄糖异构酶是较便宜的,而且可大批购到,但按生物化学标准来说,通常使用的是较不纯的。许多种需要量较少,但得到广泛使用的酶,特别是用于临床分析的酶,如葡萄糖氧化酶和胆固醇氧化酶等,要求它们有适当的纯度,与工业酶相比,使用的量较少,而且它们常常是相当昂贵的。这是因为需使用一系列容量和效率都较低的纯化技术,因此需要大量成本和高劳务费用。第三方面是通常研究用的特定的酶,往往是特制的,而且对纯度的要求也是多种多样的,它们的使用很有限,一般说是极其昂贵的,因此由于耗资过多而无法进行大规模试用。这常常是限制以新型酶为基础

的产物和工艺发展的因素，因为酶的供应厂商在工业化生产对酶的大量需要出现之前，一般是不会以合理的价格使大量酶上市的。显然，工业生产的需求只是在生产过程能够扩大，并能在工业生产的条件下检验，以及有足够的产品作应用试验和毒性检验之后才会出现。

3.3.1 工业酶的特征

酶与其他物质不同，是通过它们的活性来识别和出售的，而不是通过重量，因此酶制剂在贮存期的稳定性是十分重要的。工业生产中所用的酶极少是结晶的、化学纯的或甚至达到单种蛋白质制剂。只是要求酶制剂中的这些杂质不干扰酶的活性。但是酶的杂质会催化生成副产物，或有出现毒物的危险。例如，强致癌的黄曲霉毒素可能会污染黄曲霉的提取物。在这种情况下，毒素的存在会阻碍酶的使用。提到毒物的危险时，应看到酶的潜在致过敏活性，也应注意到常常从产酶细胞来的有毒代谢产物。酶制剂中最常见的杂质往往是酶本身的失活分子。

在食品加工中采用的工业酶，对总加工过程费用来讲必须是便宜的，而且必须在传统食品加工步骤中占主导地位的物理条件下起活性作用。也就是说，希望筛选在这些条件下表现活性的不同的酶，而不是操纵已确定的加工过程或产物以适应有潜在用途的新酶。酶必须是稳定的，许多种工业用酶是在 50℃ 以上的温度下操作的，而且供应数量要充足，又要安全。因为报请法规制订当局审批的费用高昂，只要有可能，采用已获准在食品中使用的酶要比一种新酶获得合法地位容易得多。这里还要特别提到，同一种酶可以有不同方面的应用，例如， α -淀粉酶可用于啤酒酿造和烘烤食品，蛋白酶用于啤酒酿造、烘烤食品、干酪制造以及使肉嫩化等方面。

大多数酶制剂是在食品制备和加工过程中发挥它们的功能,而不在最终产品中起作用。这样使用酶有好处,因为酶是在温和的 pH 和温度等条件下操作的,这与保持食品理想的组织和其他一些性质是一致的,并且可减少加工过程的能耗;而化学催化剂是采用高温和高压,这对产品会产生有害的影响。

实际上,在终产品物流中残余的酶通常是很少的,如果产物是用于食品和药用,酶可看作为加工过程的助剂。在某些情况下,这些酶包括在食品添加剂的范畴中,因为它们在以后的加工过程中还会起作用。从这两点看,使用固定化酶就有额外的好处,固定化酶或固定化细胞一般是可以从反应混合物中全部回收。这样就可以反复使用而不沾染上终产物,也不需要把产物加热使酶失活。因为产物对温度敏感,所以热失活过程并不总是可采用的。此外,由于固定化酶可以回收和再用,使用的浓度可比游离酶高得多,缩短了反应时间,进行反应所需的容器缩小,而且实际上在终产物中不存在酶,这样不用作为食品添加剂,而只需以食品加工助剂就可报请批准。

3.4 酶的来源

微生物细胞是工业用酶的常用来源。而传统使用的动植物来源的酶是例外,如用于肉嫩化的植物蛋白酶(木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶)以及制干酪用的小牛凝乳酶。绝大多数微生物酶仅是由 25 种左右的微生物所产生的,其中包括 12 种霉菌。有人估计,实际上仅对世界微生物总数的约 2% 作过能否作为酶源的测试。

微生物酶要比动植物来源的酶更加有用。这是因为可利用的催化活性种类繁多,通过抗生素生产中广泛采用的深层通气发酵技术,偶尔也用表面培养技术,可开发出质量稳定、

价格低廉、货源充足的产品。同时，因为微生物酶通常要比相应的动植物酶稳定得多，它的生产通常比从动植物来源的酶操作方便和安全。采用遗传和环境调控技术增加细胞产率 (Demain, 1971)，以及用使细胞合成所需的组成酶、诱导酶，或者使细胞产生改变了的酶 (Betz 等, 1974) 等方法以增加细胞的酶活性，在微生物细胞中是不难办到的。这是因为它们的世代时间短，营养需求较简单，也因为针对所需特性的筛选过程较容易。在以下情况下这些技术尤其重要，即在多酶转化中活性或稳定性有限的酶；需解除合成所需要的酶的正常调控；希望减轻或去除底物或产物抑制作用，这种产物抑制作用是体内代谢途径中防止产物过多的调控机制；以及要获得另外一些有用的特性等。获得有用特性的很有趣的一个例子，是把产淀粉葡萄糖苷酶的黑曲霉高产菌株和低产菌株进行遗传重组，从而提高了淀粉葡萄糖苷酶的生产，同时使高产菌具有和低产菌株相同的良好的发酵液过滤特征 (Ball 等, 1978)。一般说，加快酶生成速率和加大细胞内或发酵液中的酶浓度的目的在于降低酶的生产成本。其中酶浓度是特别重要的，因为它也决定着为获得所需酶量而必须加工的材料量。酶的产率等于所得的细胞量乘其酶活性，胞外酶则等于所得的酶浓度乘以容积活性。因此，须把选得的微生物菌株、最适发酵条件、最适回收条件以及良好工作条件下的最合适设备等条件进行最佳组合。细胞通常是深层培养在有良好搅拌和通气的发酵罐中，但是相当数量的工业上重要的酶是用固态或半固态发酵培养获得的。这些酶包括米曲霉的乳糖酶、 α -淀粉酶和蛋白酶；黑曲霉的果胶酶和蛋白酶；根霉的 α -淀粉酶；微小毛霉的凝乳酶等。

只要有可能，就要选用不形成毒素的不产孢子菌株。此外，采用通常需要有诱导物来产某种酶的产酶细胞组成突变

型,以及抗分解代谢突变型也是有好处的。因此,在生长培养基中可使用葡萄糖和其他糖类而不会对所需酶形成阻遏。

一般地说,高等植物不是工业用酶和临床用酶的理想酶源,因为高等植物细胞的液泡中积聚着废物。而这些化合物常常是酶的抑制剂和(或)毒素,特别在接触空气氧化后抑制作用更强。其中大多数为酚类的废物,将在细胞破碎时逸出,污染并使提取出来的全部酶失活。

虽说微生物在系统发育和生物化学方面多种多样,但是因为受到法规的限制,仅有相当有限的微生物种类用作酶源。从一种微生物很可能纯化出几种酶,这确实会收到节约的效果;酶的分离和纯化,特别以大规模进行时,常常是生产厂商最终生产成本的主要组成部分。黑曲霉、米曲霉和枯草芽孢杆菌是最有用的产酶微生物(表 3.1)。一般地说,真菌酶的最适作用 pH 为中性或酸性,并且不耐热,而细菌酶的最适作用 pH 趋于中性或碱性,常常是热稳定的。

至今,最常用的是胞外酶,原因有以下几点:不需要破碎细胞和分离细胞碎片;从发酵罐中可获得高达 1% (v/v) 的产率,要比胞内酶的收率(以容积计)高不少;胞外酶常可得到比胞内酶更纯的制剂形式;胞外酶通常要比存在于胞内的酶稳定,也许是因为胞外酶常含有双硫键之故。有些胞内酶已有重要的工业生产应用,如葡萄糖异构酶、葡萄糖氧化酶、青霉素酰化酶、天冬酰胺酶等。几乎可以肯定地说,这些酶的胞外形式会是很有用的工业产品。

胞内酶或胞外酶的合成是细胞代谢的一个方面,这是特别重要的,因为它会影响发酵所得酶的类型和产率。最佳条件往往是凭经验,部分是由所涉及过程的复杂性所决定的。Terui 等(1967)研制出一种模型。模型假定酶的合成速率与所存在的 mRNA 的量成正比例,并假定 mRNA 的量左右

步骤速率。已发现此模型与酶生产的几种发酵过程所得的实验结果相符。

现在流行的看法认为,分泌出来的酶是在膜结合的多核糖体上合成,在酶分泌的时候,专一的蛋白酶切掉前体蛋白质含有的疏水氨基酸序列(信号肽)(Ramalay 1979; Priest, 1983)。在培养基中加进表面活性剂可提高酶分泌的产率,也许是使酶释放得快些。同样,使用酶高产的形态突变型菌株也能使产率提高,例如,用脉孢菌的形态变种得到的 α -淀粉酶、淀粉葡萄糖苷酶、转化酶如海藻糖酶的酶量要高得多(Gratzner, 1972)。

为数不多的膜结合酶中的一种胆固醇氧化酶已得到工业开发利用,这是一种用于临床测定血胆固醇的酶,它异乎寻常地位于产酶细胞的外侧,因此不用破碎细胞,只需用洗涤剂就可把酶释放出来,也避免了由于细胞破碎放出的胞内蛋白质污染酶的操作。

有关微生物酶的来源、生产和应用方面的详细资料,可参阅 Halpem (1981), Gutcho (1974) 和 Duffy (1980) 的文章。

3.5 酶的分离、纯化和配制

现在多数大批量使用的酶是胞外酶,而酶的大多数却是胞内酶和(或)膜结合酶。因此,如果要充分挖掘出酶的潜力,必须找到便宜有效的提取和纯化酶的方法,这些方法要考虑到细胞中的酶浓度一般都不高,通常不到1% (w/w)。读者可参阅 Darbyshire (1981), Bruton (1983), Lambert 和 Meers 等的全面综述。

通常人们用机械和化学法破碎细胞,使胞内酶从细胞内

释放出来,或者采用使细胞膜通透变化的方法使酶渗漏出来。破碎细胞的常用方法有高压匀浆、球磨、冻融、pH、温度、渗透冲击或用酶消化,如用溶菌酶或用溶壁微球菌的酶混合物,然后把所得的有酶活性的粗制剂用过滤或离心的办法去掉残留的细胞和细胞碎片,从而得到澄清液。离心是最常用的方法,一般使用一台到数台按大规模设计的离心机。这些离心机有管式离心机、碟片式离心机、篮式离心机、螺旋式离心机等,除了它们具有大容量外,还有可连续和半连续使用的优点(图3.2, Higgins 等,1978)。

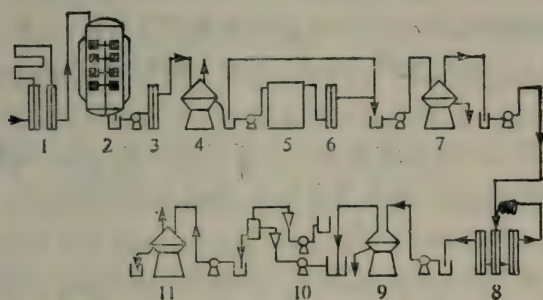


图 3.2 连续分离大肠杆菌 β -半乳糖苷酶的流程圖(Higgins 等,1978)。

1. 连续流板式杀菌器, 2. 1000 升发酵罐, 3, 6. 热交换器, 4, 7, 9, 11. 碟片式离心机, 5. 匀浆器, 8. 热交换器及收集盘管, 10. 连续流混合器。

然后可用逐步分级分离和浓缩步骤将所得的无细胞提取液纯化。这些步骤包括离子交换层析和膜技术,如超滤和反渗透,但后一种技术存在着浓度极化的严重问题。把酶沉淀下来也是常用的方法,因为许多种处理是可逆的,而且大规模使用易掌握又便宜,还不易造成变性(Wang 等,1979)。沉淀剂包括有机溶剂、聚乙二醇、葡聚糖、聚丙烯酸或能够把蛋白质从溶液中盐析出来的硫酸铵。偶尔也用凝聚剂或者絮凝

剂。酶提取的难易和收率受所用的发酵条件、收获时细胞的生长期以及加工过程受延误等因素的影响。

有关酶的纯化和分离的大规模方法的开发方面,所做的工作比较少,研究工作者常常不得不依靠扩大的实验室方法,尽管这些方法有困难、低效和费用高。如果要用凝胶过滤或亲和层析等技术生产非常纯的酶制剂,那末这样的酶制剂只能少量生产而且昂贵。为了使这些技术能在较大的规模中应用,需要发展机械强度高得多的新型载体材料。对开发新型工业化生产重要技术的需求也是明显的,例如用亲和层析法去掉过氧化氢酶。这项技术今后可能在必须去除过氧化氢酶的酶制剂制备中有不少应用,这些制剂用于分析,过氧化氢酶会在检测之前就把酶所产生的 H_2O_2 降解掉,从而干扰了分析的结果。

有少数在实验室规模中难于使用的技术,在大规模中使用却比较容易,如在篮式离心机中,酶在离子交换树脂上的吸附和解吸 (Bruton, 1983)。

回收和分离酶的批式离子交换和吸附步骤的一些例子包括用混合床离子交换剂,接着用 DEAE 纤维素层析,从每份 250 升的培养液中回收和分离链激酶;用磷酸纤维素吸附剂吸附,接着用 3% 的氨水洗脱,从人尿(每批 100 升)回收和分离尿激酶。酶的浓缩是特别重要的,因为酶通常是以容量活性作基准出售,而不是以纯度为准;也因为许多纯化技术,特别是包括层析在内的技术,除了使酶更为昂贵外,还会引起相当大的稀释。一般用超滤法浓缩酶,但像淀粉葡萄糖苷酶等较耐热的酶,可采用蒸发的办法加以浓缩。

通常酶是以含有防腐剂的浓缩液或用乳糖等膨胀剂稀释的粉剂上市的,但是固体酶制剂生成粉尘会损害人的健康。把一种活性不断下降的产品供应市场显然是困难的,因此良好

的贮存稳定性是极其重要的。

3.6 酶使用的法规

按照惯例,把酶作为天然的提取物,可以认为是安全的,真正有毒的酶是罕见的,但这种状况在世界范围内正在动摇。目前英国对属于食品加工助剂的酶在食品生产中的使用没有作特别的限制。

对于酶在食品和食品制造中的使用,大多数国家是有规定的,各地方的法规有所不同,可参阅 Roland (1981)和 Denner (1983)有关酶法规的综述。在推出一种新酶时需要通过动物饲养和其他试验以证实其无毒。需要指出的是,固定化细胞的法规并不明确,尤其是对在操作使用过程中仍保持细胞生活力的固定化细胞,更没有明确规定。

下面是食品或食品加工过程中沿用,并且一般被酶的生产公司认为是无害的,又经过许多代人长时间考验的微生物:

枯草芽孢杆菌(包括称为马铃薯芽孢杆菌、纳豆芽孢杆菌、淀粉液化芽孢杆菌的菌株)

黑曲霉(包括称为泡盛曲霉、臭曲霉、海枣曲霉、斋藤曲霉、宇佐美曲霉的菌株)

米曲霉[包括称为酱油曲霉和展曲霉(*Aspergillus effusus*)的菌株]

爪哇毛霉

少根根霉

少孢根霉

米根霉

酿酒酵母

脆壁克鲁维酵母

乳酸克鲁维酵母

酒明串珠菌

食品添加剂和污染委员会 (FACC) 以及农业、渔业和粮食部 (MAFF) 根据酶在食品 and 食品制造中的安全性, 把酶分成 5 类 (A 到 E)。此分类考虑到酶本身的固有性质, 其中包括催化活性, 由酶或酶中所含的污染物 (如来自发酵液的) 引起的一切致免疫的、过敏的或有毒的影响 (HMSO, 1982)。每一类的定义如下:

A 类: 已有的证据表明可容许用于食品。

B 类: 从已有的证据来看, 可暂时容许用于食品, 但必须在一定的观察期内取得进一步资料。

C 类: 已有的证据说明可能有毒, 只有在提供适当的安全证据并确定其可容许用于食品后才准许使用。

D 类: 已有的资料表明肯定或可能是有毒的, 不准许用于食品。

E 类: 已有的数据不充足或没有毒性的数据, 它们能否容许用于食品, 不能确定。

在复审的酶中, MAFF 推荐某些酶(表 3.3)列入可容许或暂时容许用于食品的名单中, B 类酶的数据需要在 2 年后复审。预期下面的说明、陈述和细则会按 FACC 所建议的执行。

准许使用绳状青霉和淡紫青霉所产生的右旋糖苷酶, 仅限用于蔗糖精炼的前几道工序。

获准的酶防腐剂有: 山梨酸、 SO_2 以及 4-羟基苯甲酸的甲酯、乙酯和丙酯。特别要指出, MAFF 把酶作用的食品产品分成三类: 添加剂、调味剂及膨胀剂。

表 3.3 英国农业、渔业和粮食部的酶制剂分类(1982)

来 源	酶制剂
(i) A 类	
菠萝 (<i>Ananas comosus</i>)	菠萝蛋白酶
菠萝 (<i>Ananas bracteatus</i>)	菠萝蛋白酶
番木瓜	木瓜蛋白酶
	木瓜凝乳蛋白酶
牛胰、山羊羔、绵羊羔的可食用的口腔或前胃组织	三酰甘油脂肪酶
猪或牛胰组织	三酰甘油脂肪酶
	α -淀粉酶
	胰蛋白酶
猪胃粘膜	胃蛋白酶 A
	胃蛋白酶 B
	胃蛋白酶 C
牛胰、山羊羔或绵羊羔的皱胃	凝乳酶
成年牛的皱胃	牛胃蛋白酶 A
	牛胃蛋白酶 B
牛肝	过氧化氢酶
(ii) B 类	
黑曲霉	α -淀粉酶
	固定化的及未固定化的外切-1-4- α -D-葡萄糖苷酶(葡萄糖淀粉酶)
	纤维素酶
	β -D-半乳糖苷酶(乳糖酶)
	内切-1,3(4)- β -D-葡聚糖酶
	葡萄糖氧化酶
	过氧化氢酶
	果胶酯酶
	果胶裂合酶
	聚半乳糖醛酸酶
米曲霉	α -淀粉酶
	中性蛋白酶
凝结芽孢杆菌	固定化的和未固定化的葡萄糖异构酶
地衣形芽孢杆菌	α -淀粉酶
	丝氨酸蛋白酶

表 3.3 (续)

来 源	酶制剂
枯草芽孢杆菌	α -淀粉酶 内切-1,3(4)- β -D-葡聚糖酶(昆布多糖酶) 中性蛋白酶
栗疫菌	栗疫菌羧基蛋白酶
产气克雷伯氏菌	茁霉多糖酶(支链淀粉酶)
米黑毛霉	酸性蛋白酶
微小毛霉	酸性蛋白酶
埃默森青霉 (<i>Pen. emersonii</i>)	内切-1,3(4)- β -D-葡聚糖酶
绳状青霉	右旋糖苷酶
淡紫青霉	右旋糖苷酶
酿酒酵母	β -D-呋喃果糖苷酶(蔗糖酶)
弗氏链霉菌	丝氨酸蛋白酶
橄榄色链霉菌	固定化葡糖异构酶
绿色木霉	纤维素酶

3.7 酶的制造厂

表 3.4 列出销售酶的公司详表,其中约有 6 家公司在销售的品种、质量和产量方面占主要地位。还有称为“微生物食品酶生产者协会”(“The Association of Microbial Food Enzyme Producers”)的行业协会。表 3.2 简列出目前用于工业的酶。英国 Porton Down 的 PHLS 以冻细胞体浆作酶源出售。

依组成新公司来衡量,发展最迅速的似乎是在酶作为分析工具方面。这是由于在通过法规之前不需要进行耗资可观的测试,而且新的设想不必经过中试规模设备的扩大,就能较迅速地投入工业化生产,这一点与工业酶学的其他范围不同。

表 3.4 一些工业酶的供应公司(附地址)

A.B.M. Chemicals Ltd,
 Poleacre Lane, Woodley, Stockport, Cheshire, SK6 1PQ, UK
 Advance Biofactures Corporation,
 35 Wilbur Street, Lynbrook, NY 11563, USA
 Aktiebolaget Montoil,
 Fack S 100 55, Stockholm, Sweden
 Akzo Chemie,
 Statwinstraat 48, P.O. Box 247, The Netherlands
 Alltech Inc,
 271 Gold Rush Road, Lexington, Kentucky 40503, USA
 Alpha Color S.P.A.,
 Via Valtellina 48, 20159 Milan, Italy
 Amano Pharmaceutical Co. Ltd,
 1-21-chome, Nishiki, Naka-Ku, Nagoya, Japan
 A.P.I. Laboratory Products Ltd,
 Unit D2, Grafton Way, Basingstoke, Hants, UK

 Armour Pharmaceutical Co. Ltd,
 Jampden Park, Eastbourne, Sussex, BN22 9AG, UK
 B. D. H. Chemicals Ltd,
 Broome Road, Poole, Dorset, BH12 4NN, UK
 Beckman Instruments, Inc. (Microbics),
 6200 El Camino Real, Carlsbad, CA92008, USA
 Biddle Sawyer and Co. Ltd
 P.O. Box 170, 3 Lovat Lane, London EC3P 3EX, UK
 Biochemi G.m.b.H.,
 Bulkmarketing,
 Kundle, Tyrol A-6250, Austria
 Biocon Ltd,
 Kilnagleary, Carrigaline, Co. Cork, Eire
 Biotec, Inc,
 2800 Fish Hatchery Road, Madison, WI 53711, USA
 Laboratories Biotrol,
 Div: Clinical Diagnostic Div, 1, rue de Foin, 75140 Paris Cedex 03, France
 Biozyme Laboratories Ltd,
 Unit 6, Gilchrist-Thomas Estate, Blaenavon, Gwent, NP4 9RL, UK
 Böhrringer Ingelheim,
 Bdrreich Chemikalien, Ingleheim am Rhein 6507, W. Germany
 Boehringer Co. (London) Ltd
 Bilton House, 54/58 Uxbridge Road, Ealing, London W5 2TZ, UK
 Boehringer Mannheim G.m.b.H.,
 P.O. Box 51, D-6800 Mannheim 31, W. Germany
 Calbiochem,
 P.O. Box 12087, San Diego, Ca92112, 10933 N. Torrey Pines Road,

USA

Cambrian Chemicals Ltd,
Suffolk House, George Street, Croydon, CR9 3QL, UK
Cambridge Medical Diagnostics, Inc,
575 Middlesex Turnpike, Billerica, MA 01865, USA
Chr. Hansen Laboratories A/S
3 Sankt Annae Plads, DK-1250 Copenhagen, Denmark
CIBA-Geigy Ltd
Basle, Switzerland
Collaborative Research Inc,
Research Products Div, 1365 Main Street, Waltham, MA 02154, USA
Corning Biosystems,
Corning Glass Works, Corning, New York 14830, USA
Dairyland Food Laboratories Inc,
Progress Avenue, Waukesha, Wisconsin 53187, USA
Daiwa Kasei KK,
3-11 Vehonmachi-5-chome, Tennoji-ku, Osaka, Japan
Diamalt,
Friedrechstasse 18, D-800 Munchen 40, Postfach 400 469, W. Germany.
Diamon Shamrock,
620 Progress Avenue, Waukesha, Wisconsin 53186, USA
Diosynth BV,
P.O. Box 20, Oss, The Netherlands
Enzyme Center, Inc,
33 Harrison Ave, Boston, MA02111, USA
Enzyme Development Corporation,
2 Penn Plaza, New York, New York 10121, USA
Fermco Biochemics Inc,

2638 Delta Lane, Elk Grove Village, Illinois 60007, USA
Genzyme Biochemicals Ltd,
Springfield Mill, Maidstone, Kent, ME14 2LE, UK
Genzyme Corporation,
1 Bishop St., Norwalk, CT 06851, USA
Gist Brocades NV,
P.O. Box 1, Wateringseweg 1, Delft 2600MA, The Netherlands
Glaxo Operations UK Ltd,
Ulverton, Cumbria, LA12 9DR, UK
Godo Shusei Co. Ltd,
6-2-10, Ginza, Chuo-ku, Tokyo, Japan
Grindestedvaeket A/S,
38 Edwin Rahrs Vej, 8220 Braband, Denmark
Grindstedvaerket, G.m.b.H.,
D-2 Hamburg 54, Kellerbleek 3, Postfach 54097, W. Germany
Grinsted Products Ltd,

Northern Way, Bury St. Edmunds, Suffolk, 1P32 6NP, UK
 Hankyu Kyoei Bussan Co. Ltd,
 5/6 chome, Tenjin Bashi-suji, Oyodo-Ki, Osaka, Japan
 Hayashibara Shoji Co. Ltd,
 198 Shimoishii, Okayama City, Japan
 Henkel KG a.A.,
 d-4000 Dusseldorf 1, Postfach 1100, W. Germany
 Hoechst,
 D-6000 Frankfurt/M80, Postfach 800320, W. Germany
 Hopkins and Williams Ltd,
 P.O. Box 1, Romford, Essex, RM1 1HA, UK
 Hughes and Hughes (Enz.) Ltd,
 Elms Industrial Estate, Church Road, Harold Wood, Romford, Essex, RM3 0HR, UK
 Kingsbridge Industrial Inc,
 P.O. Box 24, 200 Tapei, Taiwan
 Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd,
 Ohtemachi Building, 6-1, Ohtemachi, 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan
 Laboratories Sanders SA
 47-51 rue Henri Wafelaerts, Brussels 6, Belgium
 Dr. Madis Laboratories Inc,
 375 Huyler Street, S. Jackensack, New Jersey 07606, USA
 Meiji Seika Kaisha, Ltd,
 Kyobashi, Chuo-Ku, Tokyo, Japan
 E. Merck,
 Frankfurter Str. 250, Postfach 4119, D-6100 Darmstadt 1, W. Germany
 Miles Kali-Chemi G.m.b.H.,
 3, Hannover-Kleefeld, Hans-Buckler Allee 20, Postfach 690367, W. Germany
 Miles Laboratories, Inc,
 Research Products Div, P.O. Box 2000, 1127 Myrtle Street, Elkhart, IN 46515, USA
 Miles-Seravac (Pty) Ltd,
 Moneyrow Green, Holyport, Maidenhead, Berkshire, UK
 Millipore U.K. Ltd,
 Millipore House, 11-15 Peterborough Road, Harrow, Middlesex, HA1 2YU, UK
 Mitsui and Co. Ltd,
 P.O. Box 822, Tokyo Central, Japan
 Munton and Fison Ltd,
 Cedars Factory, Stowmarket, Suffolk, IP14 2AG, UK
 Murphy and Son Ltd,
 Wheathampstead, St Albans, Hertfordshire, UK
 Naarden Internation NV,
 Postbus 2, Naarden-Bussum, The Netherlands
 Nagase and Co. Ltd,
 Konishi Building, 2-2-chome Honcho, Nihonbashi Chuo-ku, Tokyo, Japan

New England Biolabs, Inc,
 32 Tozer Road, Beverley, Ma 01915, USA
 New Englands Enzyme Centre (Tufts),
 Tufts Medical School, 136 Harrison Avenue, Boston, MA02111, USA
 Otto Norwald KG,
 2 Hamburg 50, Heinrichstrasse 5, W. Germany
 Novadel Ltd,
 12/14 St Ann's Crescent, Wandsworth, London, SW18 2LS, UK
 Novo Industri A/S,
 Novo Alle, DK-2880 Bagsvaerd, Denmark
 Ikasa Industriae Comercia de Diastase Ltda,
 Rue Araraquara, 41-Diadeima-SP, Brazil CEP 09900, Caixa Postal 352, Brazil
 Organnon Laboratories Ltd,
 Newhouse, Lanarkshire, ML1 5SH, UK
 Oriental Yeast Co.
 Enzyme Development Centre, 4-1 Minamisuta 4-chome, Suita, Osaka 564, Japan
 Pfizer Inc,
 World Headquarters, 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, USA
 Pharmacin State Economic Trust,
 15 Iliensko Chaussee, Sofia, Bulgaria
 PHLS Centre for Applied Microbiology and Research,
 Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, UK
 P.L. Biochemicals Inc,
 1037 West Mckinley Avenue, Milwaukee, Wisconsin 53205, USA
 Powell and Scholefield Ltd,
 38 Queensland Street, Liverpool, L7 3JG, UK
 Premier Malt Products Inc.,
 1137 North 8th Street, Milwaukee, Wisconsin 53210, USA
 Rohm G.m.b.H.,
 Kirshenallee, Postfach 4-42, D-6100 Darmstadt 1, W. Germany.
 Rohm and Haas Co,
 Independence Mall West, Philadelphia, Pennsylvania 19105, USA
 Royal Netherlands Fermentation, Ind. Ltd,
 P.O. Box 1. Delft, The Netherlands
 Schering AG,
 1-Berling 65, Mullerstr 170-172, W. Germany
 Schmitt-Jourdan,
 22 Rue de la Tourellw, 92100 Boulogne-Billancourt, Paris 8, France
 G. D. Searle and Co,
 2634 South Clearbrook Drive, Arlington Heights, Illinois 60005, USA
 Sigma Chemical Company Inc,
 St. Louis, Morrisvilles, Missouri, USA
 Societe Rapidase,
 15 rue des Comtesses, 59113 Seclin, France
 Societa Prodotti Antibiotici,
 20143 Milano, Via Biella, 8, Italy
 Sturge Chemicals, Denison Road, Selby, North Yorkshire, YO8 8EF, UK

Sumitomo Shoji Kaisha Ltd,
2 Nishikicho Building 24-1 Kandanishikicho 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan
Swiss Ferment Co,
Yogesenstrasse 132, 4056 Basel 13, Switzerland

Tanabe Seiyaku Co. Ltd,
via Siber Hegner Benelux BV, Postbus 414 Rotterdam, Westersingel 107,

Japan and The

Netherlands

Ubichem Ltd,
281 Hithermoor Road, Stanwell Moor, Staines, TW19 6AZ, UK
United States Biochemical Corporation,
P.O. Box 22400, Cleveland, OH44122, USA
Vifor SA,
48 route de Drize, 1227 Carouge, Geneva, Switzerland
W.B.E. Ltd,
Sandyford Industrial Estate, Foxrock, Dublin 18, Eire
Windsor Laboratories Ltd,
Bedford Avenue, Slough, Berkshire, UK
Werthington Diagnostics,
P.O. Box 650, Hall Mill Road, Freehold, NJ 07728, USA
Yakult Biochemical Co. Ltd,
8-21 Jingikan-Machi, Nishinomiya-shi, Hyogo, Japan

3.8 生物化学应用

酶是生物化学研究的核心之一。一般使用游离(可溶的)酶,但固定化酶是解决理论生物化学问题的一种有用的方法,这些包括以下几方面:

1. 使用过滤、离心或其他方法能很迅速地把固定化酶从反应混合物中去掉(如固定到磁敏载体上的酶可用磁铁吸除),这样很容易中止反应。在使用可溶酶的情况下,必须使用酶变性的方法才能中止反应。此外,固定化酶回收后可方便而且迅速地转到不同的容器中,这是游离酶做不到的,因此可使用不同的反应条件。Zingard 和 Uziel(1970)把固定化

碱性磷酸酶用于通过内切核酸酶进行的 t-RNA 的顺序分析；Knorre 等(1973)把磷酸单酯酶、蛇毒与三嗪染料一起固定到 DEAE-Sephadex 上,用于测定寡核苷酸的核苷酸组成。

2. 用共固定化酶形成新型代谢途径,要比把相应的酶一起用在游离溶液的反应速率快。这是因为共固定化酶的扩散层可以重叠或彼此很接近。于是一种酶产生的代谢中间产物在变成第二种酶的底物之前,所经过的扩散距离要比游离酶用在溶液中同样进行扩散的距离短。

3. 用固定化来研究酶的亚单位结构。例如,可以把酶的一个亚单位固定化,而另外的亚单位解离,然后用固定化亚单位和游离亚单位作重聚的杂交实验研究 (Swaisgood 等, 1976; Horton 和 Swaisgood, 1976)。

4. 固定化酶已广泛用于亲和层析分离酶抑制剂和标记的肽。Fritz 等(1969)把抑制剂的粗提取液下行通过内含适当的固定化酶的柱,再用酸性缓冲液解离固定化酶/抑制剂复合物,然后将抑制剂洗脱下来,采用此法可分离到胰蛋白酶抑制剂,胰蛋白酶-血纤维蛋白溶酶抑制剂和胰蛋白酶-激肽释放酶抑制剂。用类似的方法还从小麦胚芽中分离出蛋白酶抑制剂 (Fritz 等,1970)。Givol 等(1970)用溴化氰制备出共价结合到琼脂糖上的核糖核酸酶柱。然后他们用一种底物类似物,5'-氨基苯磷酰鸟苷-2'-(3')-磷酸的重氮化衍生物对可溶的核糖核酸酶的酪氨酰残基作了标记,然后用羧甲基化作用和胰蛋白酶水解标记的酶。水解产物下行通过对底物类似物有亲和力的固定化核糖核酸酶柱。这样就可把含有底物类似物的肽从水解物中分离出来。同样,用抗 DNP 琼脂糖柱分离出 DNP 标记的肽。固定在同样载体上的异亮氨酸-t-RNA 合成酶也已用于分离专一于异亮氨酸的 t-RNA (Denburg 和 Deluca, 1970)。

5. 固定化酶有时是膜结合酶的有用模型, 因为固定化酶和膜结合酶都是附着在固体载体上起作用的。这个模型适合于将提取出来的膜结合酶再固定到较明确的载体上进行研究, 脂质体是一种合适的载体 (Gregoriadis, 1976)。

Storelli 等(1972)的研究工作是很好的例子, 他们用蔗糖酶-异麦芽糖酶复合物作为主动传送的模式系统。酶掺入到纯磷脂混合物中, 这种混合物在通过把装置分成两间隔的聚四氟乙烯平板上的小孔铺展开时, 可自发形成称为黑脂膜的单种类脂的双层, 加入到一个间隔中的蔗糖很快消失, 并且在第二间隔中出现果糖, 其速率要比不掺入酶或酶受到抑制时, 只是蔗糖或果糖的扩散作用速率要快几个数量级。而当把酶加入到制备好的膜中时不发生蔗糖的运送。

6. 固定化是保持酶反应条件恒定的一种方法。反应物浓度在活体内总是在变动着的, 而且在反应过程中常常活跃地进行着酶的合成和(或)降解。在体外批式实验室实验中, 底物浓度下降, 产物积累, 酶不可能处在稳态环境中。然而, 固定化酶却能保持基本稳定的反应条件, 但要求把固定化酶装在

表 3.5 固定化技术对产生异麦芽蔗糖的大黄欧文氏菌 (*Erwinia rhapontici*) 细胞的活性和稳定性的影响

固定化技术	活性 [g 产物/g 固定化细胞/h]	半衰期 (h)
海藻酸钙	0.325	8500
DEAE-纤维素	0.583	400
聚丙烯酰胺	0.13	570
戊二醛聚集的细胞	0.153	40
K-角叉菜胶-刺槐胶	0.263	37.5
骨炭	0.01	25
琼脂	0.34	27
黄单胞菌多糖-刺槐胶	0.10	8

引自 Cheetham 和 Bucke, 1982。

填充床反应器或连续搅拌罐反应器中使用,反应时以恒定的速率向酶不断供给新鲜底物,并不断去掉产物。

7. 常常可用固定化方式稳定酶活性,不同的固定化方法常会有相差很悬殊的稳定效应(表 3.5)。

读者要了解固定化方法的详细情况,可参阅《酶学方法》44 卷 [*Methods in Enzymology* 44 (ed. Mosbach. K.), Academic Press, 1976]。

3.9 酶在分析中的应用

3.9.1 概况

酶在分析中的最著名的应用是作为临床生物化学中特别有用的可溶酶的酶“试剂盒”(“kit”)。例如,用葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶测血糖;用胆固醇氧化酶和胆固醇酯酶测胆固醇。近来普遍使用酶电极,在电极中酶是联结到利用电位测定或电流测定的转换器上。首先记述的是用葡萄糖氧化酶电流检测葡萄糖(Clark 和 Lyons, 1962)。酶的底物立体专一性及对底物的高度亲和性等特性可在“无试剂”分析装置中得到利用,因此除了可检测化学试剂及其浓度外,还能为化学试剂的光学纯度提供证据。当使用自动化闭路续流分析仪器时,固定化酶的这种分析应用是特别有用的。

间接酶电极包括用专一的,通常是离子选择电极来检测酶反应物。直接酶电极把偶联到电极的氧化还原酶和包括在酶反应中的辅因子与电极间的电子流并在一起。转换器结合酶是由与转换器(如氧电极)密接的酶薄层和确保酶在位的薄半透膜组成的。底物从浸电极的溶液扩散进入并发生反应,然后用转换器测产物。pH 电极和铵离子选择电极也是常用的电位电极。相反,电流检测转换器通常是测电活化形式的

表 3.6 酶电极探针

类 型	酶	传感器
乙酸,甲酸	醇氧化酶	Pt
乙酰胆碱	乙酰胆碱酯酶	胆碱
乙酰- β -甲基胆碱	乙酰胆碱酯酶	乙酰胆碱
腺苷单磷酸 (AMP)	5-腺苷酸脱胺酶	NH_4^+
醇 ^a	醇脱氢酶	Pt
	醇脱氢酶/心肌黄酶	Pt
	醇氧化酶	Pt
D-氨基酸 ^b	D-氨基酸氧化酶	NH_4^+
L-氨基酸 ^c (通用的)	L-氨基酸氧化酶	气体 (NH_2)
		NH_4^+
		Pt
	脱羧酶	CO_2
L-精氨酸	精氨酸酶	NH_4^+
L-天冬酰胺	天冬酰胺酶	NH_4^+
L-半胱氨酸	变形杆菌 (<i>Proteus morganii</i>)	H_2S
L-谷氨酰胺	谷氨酰胺酶	NH_4^+
L-谷氨酸	谷氨酸脱氢酶	NH_4^+
	谷氨酸脱羧酶	CO_2
L-组氨酸	组氨酸酶	NH_4^+
L-赖氨酸	赖氨酸脱羧酶	CO_2
L-甲硫氨酸	甲硫氨酸解氨酶	NH_3
L-苯丙氨酸	苯丙氨酸解氨酶	NH_3
L-酪氨酸	酪氨酸脱羧酶	CO_2
	酪氨酸酶	气体 (O_2)
苦杏仁苷	β -葡萄糖苷酶	CN^-
丁酰硫胆碱	胆碱酯酶	Pt (SCh)
胆固醇	胆固醇酯酶/胆固醇氧化酶	$\text{Pt}(\text{H}_2\text{O}_2)\text{Pt}(\text{O}_2)$
	胆固醇氧化酶	NH_4^+
肌酸酐	肌酸酐酶	NH_3
	肌酸酐酶(纯的)	pH
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	$\text{Pt}(\text{H}_2\text{O}_2)$

表 3.6 (续)

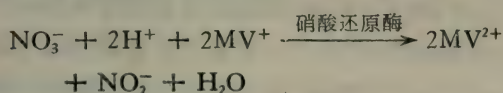
类 型	酶	传感器
乳酸	葡萄糖氧化酶/过氧化物酶 乳酸脱氢酶	Pt (苯醌)
		Pt (DCIP)
		Pt(O ₂)
		I ⁻
		气体 (O ₂)
乳糖	β-半乳糖苷酶/葡萄糖氧化酶	Pt
		Pt[Fe(CN) ₆]
麦芽糖 NADH	麦芽糖酶/葡萄糖氧化酶 醇脱氢酶 线粒体	C(NADH)
		Pt
		气体 (O ₂)
硝酸盐	硝酸盐还原酶 (亚硝酸盐还原酶)	NH ₄ ⁺
草酸	草酸脱羧酶	气体 (CO ₂)
青霉素	青霉素酶	pH
过氧化物	过氧化氢酶	Pt(O ₂)
磷酸酯	磷酸(酯)酶/葡萄糖氧化酶	Pt(O ₂)
蔗糖	蔗糖酶/变旋酶/葡萄糖氧化酶	Pt(O ₂)
琥珀酸	琥珀酸脱氢酶	Pt(O ₂)
蔗糖	蔗糖酶/葡萄糖氧化酶	Pt(H ₂ O ₂)
硫酸酯	芳基硫酸酯酶	Pt
硫代硫酸酯	硫氰酸酶	CN ⁻
尿	尿酸酶	NH ₄ ⁺
		pH
		气体 (NH ₃)
		气体 (CO ₂)
尿酸	尿酸酶	Pt(O ₂)

- 对甲醇、乙醇、烯丙醇起反应。
- 对 D-苯丙氨酸、D-丙氨酸、D-缬氨酸、D-甲硫氨酸、D-亮氨酸、D-正亮氨酸、D-异亮氨酸起反应。
- 对 L-亮氨酸、L-酪氨酸、L-苯丙氨酸、L-色氨酸、L-甲硫氨酸起反应。(Guibault, 1980)。

通量。

Hicks 和 Updike (1969) 在十几年前报道了用固定化酶进行自动化分析成功的应用。用聚丙烯酰胺包埋的乳酸脱氢酶、葡萄糖氧化酶, 通过分光光度法检测偶联染料的方法定量测定乳酸和葡萄糖。后来发展出一大系列实用装置, 其中包括测定下列项目的传感器: BOD、生物量、致癌因子、肌酸酐、 α -胎儿球蛋白、促胃酸激素、葡萄糖、谷氨酸、人绒毛膜促性腺激素、人血清清蛋白、NADH、钠离子、蔗糖、硫酸盐、梅毒细菌、尿(表 3.6)。

固定化酶在微量分析中有巨大的潜力, 可检测出环境水样中含千分之一到百万分之一的硝酸盐。在有甲基紫精时, 硝酸盐会还原成亚硝酸盐, 反应式为



式中 MV^+ 和 MV^{2+} 分别表示甲基紫精的氧化形以及单电子还原产物。反应所产生的亚硝酸盐是在 543nm 下监测经典的偶氮染料反应来测定的。此系统快速而简便, 而且比其他较常用的硝酸盐法的专一性要高。美国环境保护局已把此法作为标准技术, 可见此结果的重要意义(Senn 等, 1976)。

目前, 已开发出以电位测定阳离子和铵离子的专一电极为基础的几种酶电极。Guilbault 等 (1970) 用固定化尿酸酶产生的铵离子测定尿, 但发现 Na^+ 和 K^+ 会干扰这种测定。他们还用几种方法把 L-氨基酸氧化酶固定化, 有时与固定化过氧化氢酶结合的阳离子电极连用 (Guilbault 等, 1970)。Guilbault 和 Nagy (1973) 也记述了两种测定 L-苯丙氨酸用的酶电极。第一种酶电极是由固定在聚丙烯酰胺凝胶中的 L-氨基酸氧化酶和辣根过氧化物酶组成, 并与离子选择碘化物电

极连用；第二种是由与硅酮橡胶基载体结合同样的酶系组成。此外，还记述了用 D-氨基酸氧化酶 (Guilbault, 1971) 和天冬酰胺酶 (Guilbault, 1971) 的类似系统。因此，酶电极可广泛用于多种测定。酶电极所具有的精确度和实用性，使得它们极适用于常规的生理液临床监测。

Stone 和 Townshed (1973) 报道了测定溶液中铜的极灵敏的方法。首先用 Barker 等(1970)记述的方法，把固定到聚丙烯酰胺凝胶上的多酚氧化酶上的铜去掉，所得的脱辅基酶是可再生的，并可通过与所要测定的铜溶液一起保温而有选择地重新活化。使用固定化酶的原因是可使脱掉铜和脱辅基酶操作容易些，而且贮存的稳定性也可提高，又可重新使用。另一个有趣的例子是用固定化酶测定鱼的新鲜程度。在这种情况下，以次黄嘌呤核苷单磷酸、次黄嘌呤核苷和次黄嘌呤的积累作为鱼鲜度的指标，这些物质是用共固定化到三醋酸纤维素膜上的 5'-核苷酸酶、核苷磷酸化酶和黄嘌呤氧化酶与氧电极相连进行测定的，氧电极检测反应发生时的氧消耗。

酶基分析装置是以它们的灵敏度、响应时间及检测限度来标明它们的特性的，但受到所用酶稳定性的局限。另外的问题是这些装置的高价和响应时间长，这是由于反应物进出固定化酶和(或)细胞制剂的内在扩散受到限制造成的，并需把要测的有效浓度范围与使用酶的 Michaelis-Menten 曲线的线性部分相一致。因此，为了适用于不同浓度的反应物，需要有一系列 K_m 值不同的酶。

鉴于反应物和电极间电子传递的速度慢（即使使用媒介剂 44' 双吡啶基速度也不快），不少研究者已致力于测量酶反应热的酶电极研究。热可用热敏电阻直接测量，或通过温差电堆间接测量反应热所产生的电位势。例如，Mattiasson 等

(1977) 用测硫氰酸酶和氰丙氨酸合成酶 (ingectase EC 4.4.19) 与氰化物反应所产生的热的办法,连续监察高炉废水中的氰化物浓度(低到 $20\mu\text{mol/L}$),响应时间为 2—3 分钟。

酶电极在固定化酶的分析中已引起相当的注意,也推出了几种其他种类的应用,例如固体表面荧光法的建立。此项技术是把酶和辅因子冷冻干燥在硅酮橡胶垫上。在分析时,使垫复得水,并把欲分析的溶液加到“固定化酶”点上。定量测定是在荧光光度计中通过测荧光产生速率去进行的。这项技术与其他固定化技术具有同样的优点,增加了试剂的稳定性 (Reitz 和 Guilbault, 1975)。

固定化酶的第二种广泛应用是固定化酶搅拌器。原型搅拌器是聚四氟乙烯搅拌棒,棒上面带有用尼龙网持留住的固定化尿酶。这是与铵离子选择电极连用的。据报道,初始响应时间和灵敏度为 2 秒钟,相当于 70% 转化 (Guilbault 和 Stokbro, 1975)。

目前有希望的发展包括电场效应晶体管。这些装置是基于传统的硅栅 (silicon gate) 工艺,而且取决于离子或与整个分子有关的反应所产生的电极电势。装置通常包含嵌入到不起反应的环氧树脂等类材料中的小硅片。硅片周围是传带电流到小硅片表面的一槽传感液。由聚合物制成的膜或凝胶围绕着传感液。这些材料经过专门选择,有的打上孔,使一定大小的分子可通过,另一些则用酶或细胞等类有机物浸透,有的把有机物共价结合在上面。这些被称为生物场效应管 (BioF. E. T. s),它们与要进行分析的物质反应,产生微硅片检测得出的电位。例如,可用 β -内酰胺酶测定发酵罐中少量青霉素,也可以把完整细菌掺入到覆盖在硅片上的凝胶中。

另外一种有希望的发展是化学发光测定,这是用虫荧光

素酶进行的,涉及使用 NADH、NADPH 或 ATP 进行反应的酶或底物的非常灵敏的分析。贝内克氏菌 (*Benckea harveyi*) 的 NAD(P)H 氧化还原酶催化 NADH、NADPH 的氧化并发射出光,而萤火虫的虫荧光素酶则把 ATP 转化成 ADP 和光。

3.9.2 在临床测定中的应用 (可参阅 A 部分和 B 部分的第 5 章)

现在酶在临床生物化学实验室已作为标准实验室试剂,用于疾病诊断、跟踪病程和病人对治疗的反应及监控药物和代谢物在血液中或其他体液中的浓度(表 3.6)。读者可参阅 Price (1983) 和 Atkinson(1983) 的综述。一种重要的新发展是酶联免疫测定 (ELISA) 技术,这是把专一的抗体与过氧化物酶或 β -半乳糖苷酶等酶相连。这些反应产生色团,因而可测出抗体结合的程度。这样可获得很高的灵敏度和低临界值,不必借助于像放射免疫测定那样使用放射性同位素。酶的测定已常规用于诊断肝脏、心肌、胰脏、前列腺等的疾病,以及诊断贫血、白血病、肌肉萎缩、肿瘤、妊娠毒血症等。这些应用是根据这样一种普遍现象,即患病的细胞会渗漏,并丢失部分酶,而这些酶最终会进入血液。血清中酶活性提高到正常水平以上,主要取决于细胞受损害的程度。因此肝病测谷氨酸-丙酮酸转氨酶和谷氨酸-草酰乙酸转氨酶,因为在黄疸的第一周分别得到 $\cong 600$ 和 400mU/ml 的非常高的活性峰。心肌梗塞除测上述两种酶外,还测乳酸脱氢酶和肌酸磷酸激酶。

酶也用于药物检测、抗生素测定、抗体及抗原的检测,或用于胞外液中酶和代谢产物的检测。酶检测通常要比免疫测定快,比光度测定专一,比色谱免疫测定或放射标记免疫测定

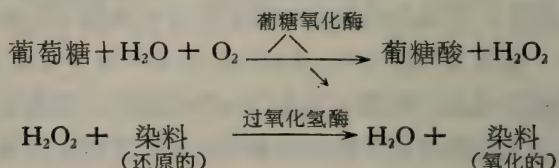
便宜。目前主要使用动物来源的酶, 尽管趋向于使用微生物酶, 特别是倾向于使用耐热的微生物酶。例如用脂肪嗜热芽孢杆菌的耐热甘油激酶, 因为目前使用的酶中, 有许多种是很不稳定的, 甚至在室温条件下也不稳定。酶的固定化是使临床用酶稳定的另一条途径。特别合适和方便的固定化方法是把酶永久性附在盘管的内壁, 这些盘管可直接组装进自动分析仪。例如把 L-天冬酰胺酶固定到尼龙管的内壁和把酶浸入滤纸条, 这样很简便直观, 甚至可在诊所和患者家中使用。这些进展似乎是由于薄膜工艺在这一领域的应用引起的。

使用微生物酶的两项最新进展, 第一, 测定血清中高毒性化疗药物, 如用于癌症化疗的抗叶酸药物氨甲蝶呤, 因为它抑制了脱氢叶酸还原酶, 所以减少了供给癌细胞的还原叶酸。氨甲基蝶呤是通过抑制干酪乳杆菌的脱氢叶酸还原酶, 用分光光度法测定的 (Falk 等, 1976)。第二是开发出快速灵敏的酶介入的比色测定法测定一种有毒的止痛药 (paracetamol), 这是以荧光假单胞菌的一种纯酶使这种药物释放出氨基酚为依据 (Atkinson 等, 1980)。此外, 也已证实酶以外的微生物蛋白质也是很有用的, 例如把金黄色葡萄球菌的蛋白质 A 联结到免疫球蛋白 IgG 分子的 Fc 区, 从而用蛋白质 A 的荧光、放射性和酶的缀合物来取代放射免疫测定的第二种抗体。

确定一种特殊底物分子浓度的测定方法应达到下面一些要求: 简便, 应测定反应的总变化而不是测反应初速度。酶应是过量的, 这样使反应完全, 而且很快达到平衡。高浓度的酶还有减少测定混合物中抑制剂影响的作用。还应使用尽可能纯的酶, 而且要专一于欲测的化合物, 以避免假阳性反应。底物浓度要低, 这样转化较快, 但浓度要达到能得出可靠结果的程度。底物浓度范围, 取决于监控装置的灵敏度。此外还应仔细控制 pH 和温度等因素。从反应开始到完成, 要测定

某些参数的总变化,如消光、荧光、气体的吸收和放出等,并与在同样条件下用一系列已知浓度的酶的纯底物所得的变化(用标准曲线表示)作比较。

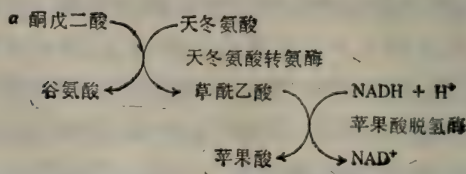
如果酶反应不产生容易测出的变化,常常要使用第二种(指示)酶。此酶与原先酶的反应产物反应,产生容易测出的产物,例如



可使用的染料有数种,每一种都是测氧化的染料量。用酶法测代谢物的实例有二磷酸甘油、葡萄糖、胆固醇和甘油三酸酯等。

如果需大量分析同一种化合物,值得考虑用自动化技术来进行此反应,并跟踪反应的变化。这些包括广泛用于临床生物化学,作常规样品分析的 Technica 自动分析仪系统。对此系统持异议的人认为,此装置要浪费昂贵的纯酶。发展简单的固定化酶技术应能避免一些这种浪费。固定化酶可以附着在一小段管子上,成为分析系统的一部分,使用酶电极的可能性也是很多的。

前面已提到,酶通常以组合酶系统形式,在临床和研究实验室中用来测定另外一种酶的活性。常用的组合酶是:



欲测的酶是天冬氨酸转氨酶,能够产生草酰乙酸,草酰乙酸又是第二种酶苹果酸脱氢酶的底物。这使它的另一底物,还原型 NAD 氧化,从 340nm 消光下降很易跟踪反应。如果要求测定准确,草酰乙酸一定不能积累,只有在草酰乙酸一形成就用掉, NAD 形成的速率才真正可作为天冬氨酸转氨酶活性的衡量尺度。由于第二种酶必须在微量的底物浓度下起作用,因此在测定的混合物中必须大大过量。Bergmayer (1953) 计算过,即使第二种酶要比第一种酶过量 100 倍,在初速度测量时,还可能有 4% 的误差。因此这些组合酶系是会很昂贵的,而且第二种酶还必须不含起干扰作用的任何污染活性。

测量初速度也可用来测定除底物以外的化合物浓度,如抑制剂、激活剂及辅基 (Townsend, 1973)。因此,现在可用酶测定各种杀虫剂、药物和金属离子的浓度。也许最令人惊奇的酶的应用是测定与酶没有特殊亲和力的化合物。Rubenstein 等(1972) 用溶菌酶来检测吗啡,检测浓度可低到 $3 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。他们把吗啡共价结合到溶菌酶上,这种化合物仍保留活性,他们还制备了抗吗啡的 γ 球蛋白。把这种抗体加到吗啡-溶菌酶复合物中,致使 98% 的酶活性受抑制。一旦把抗体加到吗啡和吗啡-溶菌酶混合物中,就会发生竞争抗体上的结合部位。因此,所检出的酶活性的量与游离的吗啡浓度有关。

现已证实,甚至完整的细胞都是有用的,例如产氢的丁酸梭菌固定化后已作为 BOD 传感器 (Matsunaga 等, 1980)。固定化荧光假单胞菌用作葡萄糖传感器 (Karube 等, 1979)。共固定的蔗糖酶、变旋酶及葡糖氧化酶用作蔗糖电极 (Sato 等, 1976)。

酶大规模用于临床生物化学的一个好例子是用于测血清

胆固醇水平的胆固醇氧化酶。这种酶来源于多种微生物,如分枝杆菌、诺卡氏菌、原放线菌、链霉菌、棒状杆菌等;还从裂褶菌中得到了专一于 3β 位的一种胞外酶(Sugiura 等,1977)。在培养基中掺入非离子型去垢剂,很有效地使酶成为胞外酶;去垢剂必须是无毒性的,而且必须不产有毒的降解产物,因此在临床测定血清胆固醇中,常用 Triton X-100 来激活分离的酶,以及使酶从生长停止后的细胞中溶出培养基中,提供给细胞的酵母膏、诱导剂及去垢剂等会对细胞的胆固醇氧化酶活性起协同作用。在酶提出来后,可用与水可混溶的溶剂或用网状结构的树脂去掉去垢剂(Cheetham, 1979),纯酶在超滤浓缩之前,用 DEAE 层析去掉有干扰的过氧化氢酶(Buckland 等, 1974)。

另一种用于血清胆固醇测定的酶是胆固醇酯酶,它是由荧光假单胞菌在添加诱导物的情况下产生的,然后纯化这种在胞内及胞外都有积累的酶(Terad 和 Uwajima, 1977)。胆固醇酯酶也可以从皱褶假丝酵母获得,用疏水层析纯化,去掉脂肪酶和其他蛋白质。

尿酸酶在痛风症和某些类型的风湿症的生物化学诊断上是很重要的,是用在检测血清尿中的尿酸来实现诊断的。尿酸酶由微球菌(*Micrococcus luteus*)产生,这种菌的酶分泌到培养基中,然后用硫酸铵沉淀并用柱层析把酶纯化(Snoke 等, 1977)。尤其是使用带有疏水配基(如 1,6-己二胺)的琼脂糖层析来去除污染的过氧化氢酶,因为过氧化氢酶在柱上的持留要比尿酸酶强得多。尿酸酶也可从黄曲霉和米曲霉获得,用研磨冻菌丝体抽提出酶,接着用柱层析纯化;也可从光癌霉素链霉菌(*Streptomyces garrius*)获得(Nakaniishi 和 Shigemasa, 1981)。

肌酸酐酰胺水解酶和肌酸酰胺水解酶是串起来使用的,

用于把肌酸酐转化成肌酸,然后再转化成尿和肌氨酸。培养产生菌(黄杆菌、微球菌或棒状杆菌),产酶并在培养基中积累。两种酶可一步得到,然后用 DEAE 层析,把两种酶分开。

NADH-过氧化物酶用于许多种产生 H_2O_2 物质的酶法测定。例如,与氧化酶反应组合,可使它与 NADH 反应生成 H_2O_2 。NADH 过氧化物酶是把粪链球菌菌体消解或用表面活性剂处理而得到的,然后纯化提取出来的酶(Röder 等, 1980)。

脱氢酶(如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)在许多用酶分析的化合物的分析测定中是重要的,如用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶分析葡萄糖。此酶用亲和层析法纯化(Röder 等, 1976)。

磷酸二酯酶在化验诊断中是有用的,而且有可能作药用。这种酶裂开在生物化学反应中起“第二信使”作用,环化 AMP 的环。从盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)得到的酶比较适用,因为这种酶的 K_m 低。由于环化 AMP 在生物材料中的浓度低,就需要低 K_m 的酶(Gerisch, 1974)。

乳酸氧化酶是用于临床测定血清乳酸含量的。现在使用的是粪链球菌所产生的一种高度专一而且稳定的乳酸氧化酶,在使用前要把这种胞内酶提取出来并加以纯化(Esders 等, 1979)。

葡糖氧化酶用于测定葡萄糖及用于抑制肿瘤的生长。在使用此酶之前,必须把污染的过氧化氢酶分开,不然过氧化氢酶会催化 H_2O_2 的降解。这可利用下面的方法来做到,即葡糖氧化酶含有碳水化合物残基,而这些残基可用葡聚糖酶或用过氧化钠加以降解,因此减轻了过氧化氢酶对葡糖氧化酶的干扰,而且这样还可以使用柱层析把这两种酶分开。另一种办法是用吡啶碱处理沉淀过氧化氢酶,或用离子交换柱层析去掉过氧化氢酶(Keyes, 1980)。在使用酶之前,可在

聚合物(如聚氧乙烯)存在下冷冻干燥,使之稳定。

在临床分析中其他有用的酶有: 甘油磷酸氧化酶 (Mitsunaga 等, 1981)、甘油激酶 (Imamura 等, 1982)、L-氨基酸氧化酶 (Yoshino 等, 1982)、半乳糖氧化酶 (Terado 和 Aisaka, 1982)、黄嘌呤氧化酶 (Nakanishi 和 Machida, 1982)、酰基辅酶 A 合成酶(硫激酶) (Yamada 等, 1981)、醇氧化还原酶 (Eggeling 等, 1981)、胆碱氧化酶 (Nakanishi 和 Machida, 1981) 和甘油脱氢酶 (Atkinson 等, 1982)。

3.10 酶的医药用途

L-天冬酰胺酶用于治疗白血病以及生长需要天冬酰胺的、扩散中的癌症 (Mauer 和 Simone, 1976)。大肠杆菌、粘质沙雷氏菌及各种欧文氏菌均产这种酶, 而凝结芽孢杆菌产生的是一种无抗癌活性的天冬酰胺酶 (Christie 等, 1974)。荧光假单胞菌产生一种有趣的蛋白质, 它具有同等的天冬酰胺酶活性和谷氨酰胺酶活性。将氨基酸(如谷氨酸)加到培养基中会刺激酶的产生, 这种酶是将细胞用碱消解而释放出来的, 然后用碱性离子交换树脂去掉污染的内毒素和热原 (Grabner 等, 1975), 或用甘油及乙醇沉淀加以纯化。

胰蛋白酶或胶原酶用于去掉外伤、烧伤和溃疡等的坏死组织, 因此除了能抑制一些污染微生物的生长外, 还能加速新组织和植皮的生长 (Sizer, 1972)。胶原酶是由一种溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*) 的无鞭毛类型所产生的, 污染的蛋白酶可用离子交换层析去掉 (Chiulli 和 Wegman, 1974)。此酶优先作用于天然胶原-Z-Pro-X-Gly-Pro-X-螺旋区的一Gly (注意: 必须要有比梭菌安全得多的产生菌所产生的胶原酶)。

角蛋白酶可用于去掉皮屑的胨状物或患牛皮癣所生成的角蛋白,也用于皮革脱毛和羊毛加工。这种酶是由须发癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) 产生的。菠萝蛋白酶也可用作清创剂 (Galbraith, 1981)。

蝶呤脱酰胺酶使蝶呤、蝶酸和叶酸脱酰胺,并具有抗肿瘤活性。此酶广泛分布于霉菌,而且已纯化了曲霉来源的酶 (Kusakabe 等, 1976)。超氧化物歧化酶作兽用消炎剂,链激酶用于溶解血块。尿激酶具有溶解血纤维蛋白及溶解血栓的活性,也可用于溶解血块。目前,尿激酶是从人尿中提取的,但正在开发从培养的细胞和工程菌中得到更为有效的供应源。链激酶是由溶血性链球菌分泌的,容易得到而且不贵 (Huna 等, 1983)。此外,这些酶的固定化形式也已使用 (Everse 等, 1981)。

从灰色链霉菌获得的一种防止动物胀气的酶,看来这种酶的作用是使胃粘液的粘度降低 (Hahn 等, 1975)。

3.11 酶作为催化剂在有机化学上的应用

3.11.1 引言

酶在化学合成中作为试剂有很大潜力,因为它们能在温和条件下能快速催化立体专一性反应,又因为它们能以极精确的反应转化成为数众多的底物,极少或根本不生成副产物。可是,有酶介入的合成在有机化学的常规操作中仍未广泛使用,也许是由于化学家们不习惯用水作溶剂,特别是不习惯在反应结束后需去掉大量的水。虽说如此,使用酶以后采用了新型的合成步骤,或通过用酶法去除保护基团和生成化学纯,特别是光学纯的产物等,大大简化现有的步骤的例子是不少的。这样的反应包括还原反应,因为脱氢酶(如醇脱氢酶)具

有广底物专一性;缩合反应,例如用依赖磷酸吡哆醇的酶合成氨基酸;无活性的碳原子官能化,如甾族化合物的羟化及单加氧酶的使用 (Jones, 1980)。

一般说,酶要比反应局限于结构上近似分子的相应化学试剂专一得多,但若不考虑有否发生异构、氧化、转移、缩合等反应,则化学试剂的反应专一性要高。有时化学试剂显示出底物专一性,但一般说这是由大于某种大小的分子的空间排阻造成的,而酶的区分要精确得多,甚至有过量的化学上类似而分子又较小的底物存在时,酶也会有选择地和特定的分子反应。在某种情况下,底物专一性可以很宽,因此常可成功地转化自然界不存在的合成化合物。

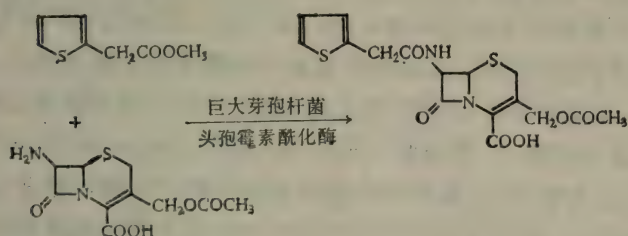
进行某些不对称化学合成的可能性是存在的,例如用了手性铑催化剂才使治疗巴金森病用的 L-多巴投入工业化生产。但这样的非酶催化反应通常是相当困难的,而且产物的收率低,与同一化合物用酶合成相比,光学纯度也较低。因为酶通常是严格的手性试剂,作为适用于确定不对称结构的不对称催化剂,酶反应产物的光学纯度显得越来越有吸引力。特别是在制订法规的部门开始需要生产光学纯的材料,以及对新型的、更复杂的药物、激素和抗生素的需求增长的情况下,就更有吸引力。

酶的结构和立体化学专一性需要在它们用于化学合成之前加以很好证实并阐明清楚。有了这样的资料,就有把握预言产物的结构和构型,甚至可预言从未试过的非生理底物。化学家们也希望酶功能单纯,即不含干扰所需反应的杂质,而且要求酶稳定、便宜、使用方便,可从市场上买到。化学家们很少自己去生产和纯化他们所用的酶 (Jones, 1980)。

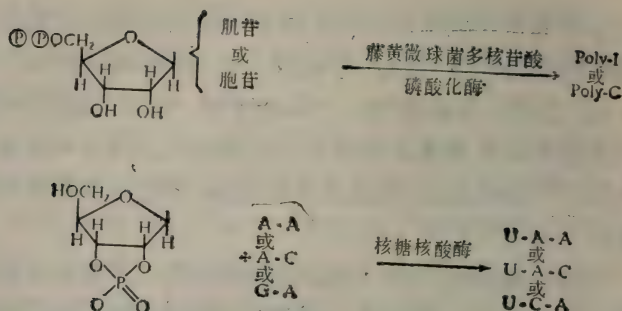
可以通过开发利用酶的结构专一性,实现具有二种或二种以上化学功能类似分子的有选择性或区域专一的反应。这

种酶很容易达到的反应却往往是用化学法极难同样达到。有些酶特别是脱氢酶、激酶、合成酶，对于所作用的底物是非常专一的，而另一些酶则进行有限的反应，如氧化酶和异构酶，它们作用于一系列通常结构上相近的底物。而另一些酶却高度专一于一种底物，且常常是一种辅酶，但是对共底物却无专一性。

与所有的反应一样，在酶催化的过程中，正常积累的是热力学优选的产物。但因为这样的反应是微观可逆的，可用适当选择反应条件诱发催化朝向热力学稍差的方向。这可用7-氨基头孢烷酸的酰化作用合成头孢金素来加以说明。在此合成过程中，开发利用续流固定化酶柱的塞流动力学使产率提高，因为在新合成的酰胺键可能发生水解之前，已趋向于去掉头孢金素 (Belg. Patent, No. 803,832,1973)。



另一个例子是多核苷酸的合成，使用酶后克服了化学合成步骤的严重缺陷。例如，多聚肌苷酸 (poly I) 和多聚胞苷酸 (poly C) 的合成 (Hoffman 等, 1970)，以及三核苷酸、U-A-A、U-A-G 和 U-G-A 的合成 (Gassen 和 Nolte, 1971)。聚合物 Poly IC 是抗病毒化合物干扰素的有效诱导物，而三核苷酸起蛋白质合成终止密码子的作用。三核苷酸合成时，在塞流柱中，用固定化酶使正常的磷酸水解反应变得不明显。这样积累了热力学稍差的产物。

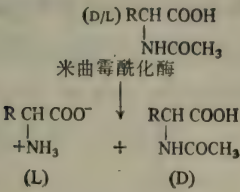


3.11.2 酶的立体专一性

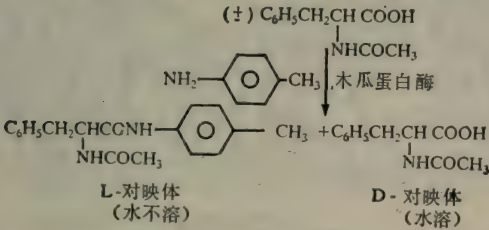
酶的绝对立体专一性是它们最显著的特征，它们具有在对映体和立体异向的基团和面之间进行区分的能力。这对于有机合成化学家来说，也许是最有用和最有价值的。在不对称基团本身反应时，相反的异构体完全不作用；但当不对称基团处于底物分子中远离酶作用的部位时，底物的两种异构体都可受到酶的作用，不过往往还是明显的优选一种异构体。实际上，用任何手性试剂都可达到只催化产生一种对映体，例如相当多地使用 L-脯氨酸 (Eder 等, 1971; Hajos 和 Parrish, 1974)。需要指出，酶只催化两种对映体形式中的一种进行转变的能力，是由于两种可能对映体变换态之间的能量有所不同，而且未附着上的异构体经常是结合到活性部位上，这样就起到竞争性抑制剂的作用。

使用酶进行工业上有用的化学合成的第一个例子，是与 D(一) 麻黄素不对称合成有关的偶姻缩合。此反应是用多种酵母属的菌来进行的，产率相当高 (Rose, 1961)。用猪肾酰化酶来拆分氨基酸的消旋混合物，这是用酶进行对映体分离的另一项重要的早期应用 (Greenstein, 1954; Jones 和 Beck, 1976)。L-氨基酸在食品、制药及化妆品工业中有重要

用途。日本用微生物酰化酶大规模拆分出 L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-色氨酸、L-苯丙氨酸的工业化生产已有十多年。以同样的方法用有酵母参与的酶水解从消旋的 α -氨基- ϵ -己内酰胺,也可以得到 L-赖氨酸 (Fukumura, 1976)。



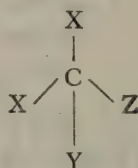
蛋白水解酶参与的拆分, 通常受到肽键或与之相应键水解的影响。与对映体的区分相反, 热力学不利的肽键形成方向也可得到开发利用, 如下列反应式所阐明的那样, 通过在水反应介质中生成不溶的对-甲苯胺产物 (L-型), 使反应平衡变换到所需的方向 (Huang 和 Niemann, 1951)。



3.11.3 前手性立体专一性

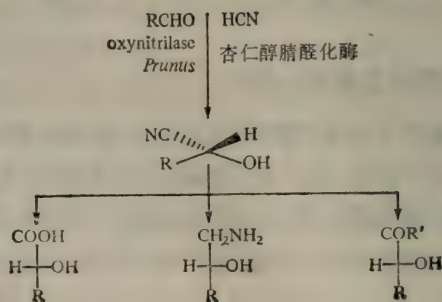
工业生产上最有用的酶反应之一是用少根根霉酶进行甾族化合物的 11α -羟化。这是目前用来制造大量可的松、泼尼松及有关的甾族化合物所用的酶反应。其流程只有 11 步, 而以往所用的化学过程需要 37 步 (Ahrnowitz 和 Cohen, 1981)。

尽管酶区分对映体的能力在拆分和不对称合成中极其重要,但用消旋混合物作底物却只有一半底物具有所需构型,留下的不需要的对映体必须重新回用或甚至丢弃。开发利用酶的前手性立体专一性可解决这个问题,因为当把酶立体专一地作用于对称的分子时,有可能把所有的底物转化成产物。这就是说,酶能区分开对称分子中化学上相同的基团(如X和X'),如



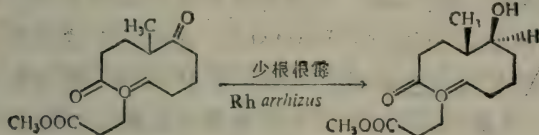
大概是施加严重位阻约束的方式把底物与酶结合,如底物的基团结合到酶表面的平面上。

例如,在实用规模中可能受到立体专一影响的 $\text{C}=\text{O}$ 加成反应,是醇腈醛化酶催化的把 HCN 加到醛上的反应。从杏仁提取的不算昂贵而买来即可用的酶,只与一大系列不同的醛底物的羰基的 Si 面反应。最好是在续流系统中使用固定化酶,然后可把得到的 R-氰醇转化成其他有用的不对称化合物,如 α -羟酸、取代的乙醇胺和偶姻(Becker 和 Pfeil, 1966)。

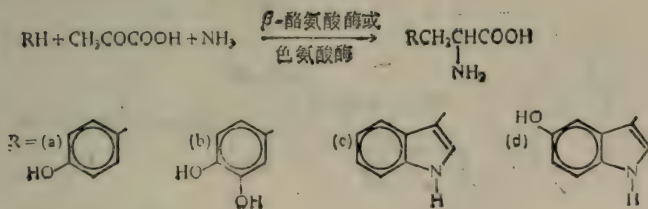


3.11.4 立体专一性联合

工业生产中使用的具有前手性识别能力的酶的重要实例,是立体专一的恰好还原戊二酮甾族化合物中的一个对映的酮基,得到的单羟产物对映体的产率为70%。此反应是一种与少根根霉结合的酶所催化的,这种酶具有双重对映体专一性,氢存在于前-R-羰基的Si-面(Bellet 和 van Thuong, 1969),而无环的酮基未发生反应。

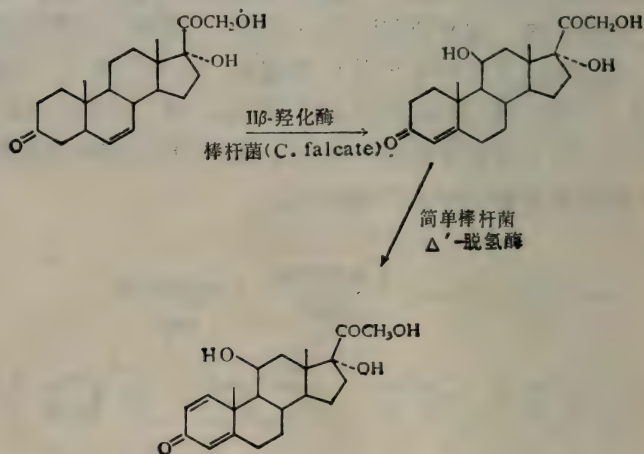


酶的各种专一性利用到何等程度的最突出的例证之一,是由需磷酸吡哆醛的酶、 β -酪氨酸酶和色氨酸酶产生产物的能力所提供的。这两种酶以其便宜的非手性前体氨和丙酮酸及合适的侧链以高产率产生 L-酪氨酸、L-多巴和 L-5-羟色氨酸(一种 5-羟色氨的前体)(Fukui 等, 1975; Abbott, 1976)。此工艺是使用固定在琼脂糖或包埋在聚丙烯酰胺中的大肠杆菌的酶柱中进行生产的。



3.11.5 多级反应

虽说使用酶可能是昂贵的，但是这些费用可从酶反应容易操作和高产率等特性中大大得到补偿，尤其是采用加入合适的酶，使许多序列反应在一个容器中进行，可明显降低费用。这种特性依赖于有关酶的底物专一性。由于所需的条件差别很大和导致产生许多副产物及所需产物低产率的非专一性等原因，反应只能使用化学试剂来进行。于是，常把形成的产物作为第二种酶的底物，而不需要分离出中间产物使产物形成达到最高，这样，第一反应的平衡有效地向有利于产物形成的方向移动。例如，由 Reichstein 化合物 S 通过氢化可的松而生成氢化泼尼松；第二个例子是用 ATP、碳酸铵和鸟氨酸生成 L-瓜氨酸；第三个例子是用半胱氨酸和泛酸生成辅酶 A。为达到最大产率，这三个例子都以固定化酶的形式在柱反应器中最佳地进行。



化学合成中使用酶的其他例子有：把乙醇转化成乙酸的醇脱氢酶和醛脱氢酶联用，或这些酶与甲醇转化成 CO_2 的甲醇脱氢酶一起使用来再生 NAP(P)H 辅因子。这些酶的最重要特点是它们的使用比例，第一步是醛形成，这是缓慢的步骤，因此反应器的醛浓度要尽可能低，以保护酶，避免失活 (Wong 和 Whitesides, 1982)。

化学合成中使用酶的更复杂的例子有：用葡萄糖-6-硫酸和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶再生 NAD(p)H 辅因子。虽说用葡萄糖-6-硫酸时酶的活性要比用葡萄糖-6-磷酸差些，但这种辅因子稳定得多。而且葡萄糖-6-硫酸较易制备 (Wong 等, 1981)。同样的途径也可扩伸到其他系统，如酶催化 N-乙酰氨基葡萄糖合成，并有尿苷二磷酸葡萄糖和尿苷二磷酸半乳糖的原位再生 (Wong 等, 1982)。

Archer 等 (1975) 进行了环状十肽抗生素短杆菌肽 S 的全部酶法合成，这种抗生素是添加到动物饲料中作为生长因子的。使用了从 3 种微生物获得的酶，其中短小芽孢杆菌的两种酶催化短杆菌肽 S 的组成氨基酸合成短杆菌肽 S，酿酒酵母的腺苷酸激酶和大肠杆菌的乙酸激酶用于合成肽键所需的 ATP 的原位再生。

3.11.6 合成放射性化合物

酶法合成常常比大多数化学催化反应要快，而且得到的非外消旋产物的产率也较高。这些优点在用昂贵和(或)不稳定的同位素时特别重要。使用固定化酶能做到快速回收产物，不染杂有抗原或热原物质。例如，用固定化酶可在 4 分钟内合成药品级的 ^{13}N -L-丙氨酸，而用游离酶进行的同样的合成，所需的时间要多得多。反应时间缩短特别重要，因为 ^{13}N 的半衰期只有 10 分钟。用固定化系统也可得到较高的收率，

这包括以谷氨酸脱氢酶把 ^{13}N -氨和 α -酮戊二酸催化形成 ^{13}N -L-谷氨酸,接着加入丙酮酸并用固定化谷氨酸转氨酶处理 (Cohen 等,1974)。

另一种重要的应用是用共固定的葡萄糖氧化酶和乳过氧化物酶,用 ^{125}I 进行蛋白质碘化。在此法中,加入葡萄糖可防止蛋白质暴露于极度氧化的环境中,因此固定化的葡萄糖氧化酶产生 H_2O_2 , 然后 H_2O_2 在标记反应中为乳过氧化物酶所利用。这种方法要比化学碘化温和得多,可防止蛋白质变性和氨基酸氧化。此外,反应很容易控制,因为固定化酶可迅速去掉,并且可用离心或上到凝胶过滤柱上等方法结束反应。

3.12 限制性内切核酸酶

限制性内切核酸酶是顺序专一的核糖核酸酶,这些酶通过把未受保护的侵入 DNA 切成片段的方式,防止外源 DNA (如噬菌体的 DNA) 的表达。所有的限制性内切核酸酶几乎毫无例外地能识别短的未甲基化的 DNA 顺序(表 3.7)。根据相对于识别顺序的切开位点的位置不同,可把限制性内切核酸酶分成两类。第一类限制性内切核酸酶在识别顺序外的位置切开双链 DNA,产生任意大小的 DNA 片段。对分子遗传学家来说,第二种类型有用得多,因为它是极端专一的,并且在它识别的顺序内精确地切开 DNA。第二类限制性内切核酸酶的切开位点是定位的,多数情况下,位于识别顺序内。大多数第二类限制性内切核酸酶识别 4、5 或 6 碱基对回文,并产生带有新发末端或交叉末端的片段。一般认为,含有 3、4 或 5 核苷酸单链尾并带有交叉末端的 DNA 片段有粘性末端。第二类限制性内切核酸酶切出的 DNA 片段,可按它们的分子量在凝胶上进行分离,然后进行顺序分析以阐明靶

表 3.7 一些限制性核酸内切酶的顺序专一性

名称	存 在	顺序
产生的粘性末端		
EcoR 11	大肠杆菌 RY13	5'..GAATTC..3'
EcoR 11	大肠杆菌 R245	$CC(\frac{A}{T})GG$
BamH 1	淀粉液化芽孢杆菌H	G↓GATCC
Bgl 11	芽孢杆菌 (<i>Bacillus globiggi</i>)	A↓GATCT
Hind111	流感嗜血菌 R _d	A↓AGCTT
Pst 1	普罗威登斯菌 (<i>Providencia stuartii</i>) 164	GTGCA↓G
Sac 1	不产色链霉菌	CAGCT↓C
Xma 1	锦葵黄单胞菌 (<i>Xanthomonas malvacearum</i>)	C↓CCGGG
Sa 1	白色链霉菌	G↓TCGAG
Xho 1	绒毛草黄单胞菌	C↓TCGAG
Ava-1	多变项圈蓝藻	C↓P ₁ CGP ₀ G
Hae 11	埃及嗜血菌	P ₀ GCGC↓P ₁
Kpn 1	肺炎克雷伯氏菌	GGTAC↓C
Sst 11	斯坦福链霉菌	CCGC↓GG
Hinf 1	流感嗜血菌 R _T	G↓ANTC
Ava 11	多变项圈蓝藻	G↓G($\frac{A}{T}$)CC
Asu 1	亚圆柱形项圈蓝藻	G↓GCC
Taq 1	水生栖热菌 YT1	T↓CGA
Hpa 11	副流感嗜血菌	C↓ \dot{C} GG
Hap 11	嗜沫嗜血菌	C↓CGG
Mno 1	非液化莫拉氏菌	C↓CGG
Hha 1	溶血嗜血菌	5'..GCG↓C..3'
Mbo 1	牛莫拉氏菌	↓GATC
产生钝性末端		
Pvu 1	普通变形杆菌	5'..CGA↓TCG..3'
Sma 1	粘质沙雷氏菌 S _b	CCC↓GGG
Pvu 11	普通变形杆菌	CAG↓CTG
Hpe 1	副流感嗜血菌	GTT↓AAC
Hind 11	流感嗜血菌 R _d	GTP ₁ PU \dot{A} C
Bal 1	浅白短杆菌	TGC↓CCA

续表 3.7

名称	存 在	顺序
Hae I	埃及嗜血菌	$\begin{pmatrix} A \\ T \end{pmatrix} GG \downarrow CC \begin{pmatrix} T \\ A \end{pmatrix}$
Hae III	埃及嗜血菌	$GG \downarrow \overset{\circ}{C}C$
Bsu RI	枯草杆菌 X5	$GG \downarrow CC$
Alu I	藤黄节杆菌	$AG \downarrow CT$

限制性内切核酸酶的缩写是取产生酶有机体属名的第一个字母和种名的前二个字母。核苷酸链中切开的部位用箭头表示,“○”标出修饰反应的甲基化核苷酸。核苷酸碱基: C, 胞嘧啶核苷; G, 鸟嘌呤核苷; A, 腺嘌呤核苷; T, 胸腺嘧啶; P₈, G 或 A; P₇, C 或 T。(Szalay 等 1979)。

存于 DNA 中的遗传信息。此外,分离出来的 DNA 片段可插入染色体外的小 DNA 中,如质粒、噬菌体或病毒的 DNA 中,这就可以研究它在原核生物细胞或真核生物细胞的克隆中的复制和表达。因此,限制性内切核酸酶和克隆技术是攻克医药微生物、农业微生物和工业微生物遗传问题的很有力的现代化工具。

已记载的限制性核酸内切酶的数目已达 400 种,其中只有约 70 种在市场上能买到。最为人们所熟知的是 EcoRI。这种酶在 DNA 分析中极为重要,因为它具有高度底物专一性,能识别双链碱基所特有的顺序,而且产生能够再联合的重叠单链末端。

大多数限制性内切核酸酶专一于鸟嘌呤核苷-胞嘧啶位点,确切知道的只有一种内切核酸酶 AhaIII 能作用于腺嘌呤核苷-胸腺嘧啶区。此酶是从耐盐和耐高温的藻类中用亲和层析法提取获得的(见 Szalay 等的综述,1979)。为了节省这些昂贵的酶,固定化方法是一种途径。Mosbach 及其同事,最近已成功地吧 EcoRI 固定化。此外,读者还可参阅 Chrikjian (1982) 的工作。

3.13 生物化学加工

以酶或细胞形式出现的生物催化剂,大多数可通过固定化然后放在反应器中使用,这样用起来要方便得多。反应器的设计是不能与催化剂的设计分割开的,因为固定化酶或固定化细胞的特性会极大地影响反应器的设计。目前,固定化生物催化剂已用在各种各样的工业加工过程中。用化学工业的标准来衡量,这些过程多数是以较小规模进行的。继葡萄糖异构酶之后,大规模加工中有潜力的酶有两种,即固定化乳糖酶和固定化淀粉葡萄糖苷酶(葡萄糖淀粉酶,糖化酶)。

在着手考察生物化学加工过程实例和酶的使用,以及研究使用酶、固定化酶、固定化细胞和酶反应器过程的详细情况之前,应强调有助于工业生产中生物催化剂成功应用的以下几个要点,因为这几点是来自工业化生产已获得或可能获得成功的酶工艺中需要考虑的特性。

1. 工艺过程应该使用简便而粗放,这样就不必精确调控使用条件,而且所用的酶也应是很稳定的。就这一点而论,使用耐热酶是有好处的,因为它们可使过程在较高的温度下操作,防止了微生物污染;而且不必加工过于粘的底物和产物物流,就可使用高浓度的溶质。此外,常常发现热稳定酶对其他变性剂的抗性也要比相应的中温酶强。

2. 使用经过法规制订部门批准、容易大量购得并能廉价大量生产的酶是有利的。

3. 与作用后底物增值相比,工艺过程应是便宜的,即生成高值小批量产物(如药物)与生成较低值大批量产物(如糖和溶剂)相比,前者可容许使用较昂贵的酶制剂。

4. 希望使用高底物浓度,以便减少必须进行加工的流体

体积及产物回收前必须去掉的溶剂体积。

5. 在反应器操作期间,应尽可能把底物转化成产物(即平衡转化),以减少底物的浪费和便于产物的分离。这样就非常希望用上平衡点很有利于产物形成的酶。

6. 希望使用高活性的酶制剂,以便缩小达到生产能力所要求的反应器尺寸和减少反应所需的时间。

7. 如果生成的产物或副产物与其他反应物处于不同的相中;产物或副产物在高 pH、低 pH、高温等条件下生成;或者它们本身(如抗生素或有机酸)有助于保持反应器在操作过程中的无菌卫生质量,这些都可简化产品的生产、纯化和分离的程序。

8. 过程参数(如存留时间、pH、底物浓度等)往往是相互依赖的。这些相互作用能深远影响操作过程和产物的质量,例如,各种因子会影响葡萄糖异构酶的活性和稳定性(图 3.3),因此应仔细进行估计。特别要指出,开始作用时生物催化剂作用的最适条件,并不一定与已使用了长时间的生物催化剂的最适条件相同。

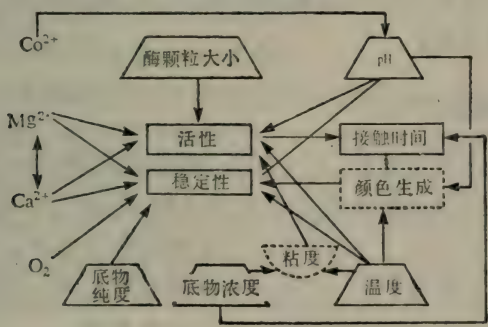


图 3.3 固定化葡萄糖异构酶各种过程变量间的相互关系 (Poulson 和 Zittan, 1976)。

第4到7可记述为过程强化,即使用尽可能小的反应器容积和尽可能少的输入能量,能够容易生成廉价的规定产物。与许多其他生物技术的论题一样,如要使酶的工业应用取得成功,就需要采用兼顾各种条件的综合办法。应认识到组成一种工艺的所有的单元过程间的相互依赖性,即工艺工程的途径是很有价值的,应优先认识全过程而不是任何单个的步骤或操作的重要性,尽管单个步骤可能是科学革新的。在研究开发的早期就应考虑到工艺工程方面的问题,并要考虑计划的最优化,还要作经济上的估测。例如,若采用的是一种昂贵的固定酶试剂,那么最好能有稍差一些但较便宜的试剂来代替它。

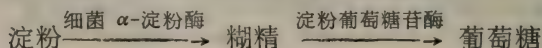
3.14 酶在食品工业中的应用

酶工业现在已从担心加蛋白酶去垢剂会产生副作用的中断中复苏,经过详尽而顺利的调研之后,一些去垢剂酶现在又重新得到采用。淀粉加工工业是酶的最大用户,这主要是由于 α -淀粉酶/淀粉葡萄糖苷酶为基础的生成葡萄糖浆的工艺获得成功。接着固定化葡萄糖异构酶生成高果糖玉米糖浆的工艺又取得成功。

3.14.1 多糖加工

淀粉是由直链淀粉(15—30%)和支链淀粉(70—85%)混合组成的。支链淀粉是带分枝的聚合物,每隔24—30个葡萄糖残基有一个 α -1,6分枝点。但某些种类的玉米、大米、高粱的“蜡状”谷物淀粉中,支链淀粉却是淀粉的唯一成分。

按下列反应,酶水解淀粉主要产生葡萄糖:



以往惯用酸水解法生产葡萄糖浆,但酸水解不可能使右旋糖当量值(DE)在高于约55时不产生异味。 α -淀粉酶和葡萄糖淀粉酶(淀粉葡萄糖苷酶,糖化酶)是淀粉工业中使用最多的酶,而且比较便宜。因此在考虑这些酶的固定化形式工业化生产之前,它们必须要有非常明显的经济或技术上的优越性,特别要考虑必须作用于大分子淀粉的细菌 α -淀粉酶。

3.14.2 细菌 α -淀粉酶(EC3.2.1.1)

在淀粉彻底水解之前,必须使它溶解。可用加热淀粉浆的办法,使淀粉颗粒破裂,分散并糊化,而结合的蛋白质会凝集。此操作是在一种设有机械剪切的喷射蒸煮器中进行,蒸气注入并加压,在100—105℃条件下水解5—10分钟。淀粉悬液通常含有30%或30%以上的干固体淀粉,这样会形成非常粘稠的悬液。近来采用 α -淀粉酶作为此过程的稀化剂。自1973年使用地衣形芽孢杆菌 α -淀粉酶以来,酶法稀化已非常普遍;因为这种细菌酶能部分耐受这种过程的极端条件,由 α -淀粉酶在短时间内可能起的有限水解作用达到糊化和稀化之后,冷却淀粉, α -淀粉酶活性可在约95℃下继续数小时,得到DE值约为12的产物。

α -淀粉酶随意水解直链淀粉和支链淀粉分子内部的 α -1,4糖苷键,得到液体粘度较低、分子量较小的产物。这种水解产物受到天然淀粉(支链淀粉)分子中分枝点的 α -1,6糖苷键的限制。水解产物的还原性葡萄糖末端具有 α 构型。此酶是由活性部位的羧基和组氨酸基的联合效应起作用的。枯草杆菌淀粉液化变种的 α -淀粉酶含有结合紧密的 Ca^{2+} 离子(每个分子含一个),钙离子是活性所需的,而且会大大提高酶的热稳定性。 α -淀粉酶是以可溶酶形式使用的,方法简便(约

85℃, pH 5.5—7.0, 作用 2 小时), 它可代替盐酸来溶解淀粉, 而用盐酸法会导致过深的颜色和形成逆反应产物。由于马铃薯淀粉和“蜡状”淀粉难糊化, 对这些原料采用二级过程, 即加第二次酶, 并继续保温达到所需的葡萄糖量为止。

大量的 α -淀粉酶是由淀粉液化芽孢杆菌生产的, 并通过诱变、限制通气、增加 CO_2 浓度等措施提高产率。此酶需 Ca^{2+} 离子, 最适作用 pH 为 6.0, 分子量为 10 000 至 20 000, 是由 4 个亚单位组成, 由一个锌原子将亚单位联结在一起, 但在结晶的 α -淀粉酶中发现 6 到 16 个亚单位的聚合物。地衣形芽孢杆菌的 α -淀粉酶要比淀粉液化芽孢杆菌 α -淀粉酶的热稳定性好, 因此可用于温度高达 110℃ 的连续淀粉液化过程中。此酶对 Ca^{2+} 稳定作用的依赖性低些, 只需 5ppm Ca^{2+} ; 而淀粉液化芽孢杆菌 α -淀粉酶却需要 150ppm。地衣形芽孢杆菌 α -淀粉酶水解淀粉主要产生麦芽糖, 开始时与麦芽己糖一起生成的麦芽三糖和麦芽戊糖, 会完全被水解掉。而淀粉液化芽孢杆菌淀粉酶的主产物却是麦芽己糖 (Norman, 1981)。淀粉稀化后, α -淀粉酶继续作用形成麦芽糊精, 麦芽糊精再继续进行随后的糖化阶段。很少一部分酶可经纯化, 用作咖啡增白剂, 以及加到蛋黄酱色拉调料之类的高脂肪产物和冰激淋中, 帮助减少热卡量。 α -淀粉酶在甘蔗加工中也找到了用途, 甘蔗中含有少量淀粉, 因此蔗汁中也含有淀粉。这种淀粉在蒸发前可用地衣形芽孢杆菌 α -淀粉酶在 85—95℃ 的温度下水解掉, 这样还破坏了蔗糖酶, 就不会发生蔗糖的转化。

已做过一些小规模固定化研究, 例如, 已将枯草杆菌 α -淀粉酶固定在溴化氰活化的羧甲基纤维素上, 并在搅拌反应器中水解小麦淀粉 (Linko 等, 1975)。固定化酶的初活性要比可溶酶的初活性低, 但因为可溶酶会发生热钝化, 固定化酶

的产率就要高些。固定化 α -淀粉酶比可溶酶产生较多的葡萄糖和麦芽糖,这是由于较大底物分子受到扩散限制,而多糖的小片段却能较容易地扩散到聚合物的内部而完全水解掉。固定化 α -淀粉酶不存在外部扩散限制,并已用于多次连续批式反应。

3.14.3 淀粉葡萄糖苷酶 (EC3.2.1.3)

淀粉葡萄糖苷酶(葡萄糖淀粉酶, α -淀粉酶或 α -1,4 葡聚糖葡萄糖水解酶,糖化酶)催化淀粉和寡糖的 1,4 键逐级水解,从分子的非还原性末端释放出 β -葡萄糖分子。此酶还水解 α -1,6 分枝键,但要慢很多,水解后生成 DE 值为 97—98、葡萄糖含量为 95—97% (w/w) 以及含 3—5% 较大分子的糖(注意,此酶也缓慢水解 α -1,3 键)。生成的葡萄糖可以糖浆形式使用,也可结晶得到纯粹的固态葡萄糖。淀粉葡萄糖苷酶已批式大规模用在淀粉加工工业中,在搅拌罐中 55—60℃, pH4.5, 保温反应 48—92 小时,使 α -淀粉酶生成的糊精变成葡萄糖。钙离子可提高酶对热和碱变性的稳定性。水解过程可用可溶酶来进行,而且便宜。在 α -淀粉酶的作用下,当淀粉可能已达 15—30% 水解时加入可溶酶。反应完成后,用热变性或离子交换层析去掉酶活性。在工业生产实践中,需要达到尽可能高的水解程度,使用的底物要尽可能浓,以减少随后的蒸发费用。在工业生产中,使用 30—40% (w/w) 的溶液,平衡反应混合物含有 94—97% 葡萄糖。与盐酸水解淀粉法相比,酶法最突出的优点是可用纯度较低的淀粉,因为蛋白杂质并不会水解成氨基酸,因此不致发生褐变反应。淀粉葡萄糖苷酶糖化后,经过滤去掉蛋白质和脂肪,然后用活性炭柱,再以离子交换树脂纯化。

淀粉葡萄糖苷酶是由曲霉或根霉的一些种产生的胞外

酶。根霉淀粉葡萄糖苷酶可分离成性质相似于黑曲霉同工酶的同工酶。淀粉葡萄糖苷酶是含有甘露糖、葡萄糖、半乳糖和糖醛酸的糖蛋白,分子量为 60 000—100 000,最适作用 pH 为 4.3—4.5。其缺点之一是对 α -1,6 键活性不大,这样,要达到所需的水解程度需加大酶量和(或)延长保温时间。因此有人提议把淀粉葡萄糖苷酶和脱支酶(茁霉多糖酶)联用。例如, Hurst (1975) 在 pH5.5—6.0 的淀粉葡萄糖苷酶作用较差的条件下加茁霉多糖酶一起进行反应,使产物的右旋糖含量提高 1—2%。虽说异淀粉酶具有更合适的最适 pH 来进行这种反应,但因为它们的热稳定性差而无法使用。

用产酶细胞包裹的办法对像淀粉葡萄糖苷酶那样的胞外酶进行固定化显然是不可能的,在生产实践中,已应用了其他各种固定化方法。淀粉葡萄糖苷酶是一种较便宜的酶,因此固定化酶的特性需要比可溶酶优越得多,才能寻求更为广泛的工业应用。虽说如此,在使用固定化淀粉葡萄糖苷酶上已作过不少尝试,以期从连续过程的优点中得益。这些优点包括使用方便,较低的投资和能源费用,由惯用的批式过程的约反应 75 小时减少到用固定化酶的存留时间不到 1 小时。因为反应时间短,出现的副反应也少,精炼费用也就比较便宜,而且工厂所需的容量要比使用可溶酶时的容量小得多(表 3.8)。

固定化淀粉葡萄糖苷酶制剂在温度高到足以避免微生物污染的条件下测定,有以月计的半衰期。但已证实用固定化淀粉葡萄糖苷酶不可能达到溶液中可溶酶所达到的水解程度。这是因为此酶的反应是可逆的,能催化从葡萄糖形成 α -1,4 和 α -1,6 键的寡糖。van Beynum 等(1980)在研究淀粉葡萄糖苷酶所生成的平衡反应混合物后,得出的结论认为 α -1,6 葡萄糖苷酶的逆反应导致异麦芽糖生成。在固定化酶

制剂中,不可避免的内扩散限制增加了反应物与酶接触的时间,因此有利于异麦芽糖、麦芽糖和其他糖等副产物形成,这样就达不到用可溶酶所达到的葡萄糖浓度(表 3.8)。

表 3.8 可溶淀粉葡萄糖苷酶与固定化淀粉葡萄糖
苷酶糖化淀粉的比较

	可溶酶	固定化酶
原料 一浓度	35%(w/w)	30—35(w/w)
—pH	4.5	4.5
—DE	10—15	30—40
反应器大小(25 000 吨/年)	60 000 l	50 001
持留时间	48—72h	0.5h
生色	明显	无
最终 DE 接近	95—97	94

Lee 等(1976)以中试工厂规模研究了固定化淀粉葡萄糖苷酶。酶的固定化实际上是在填充柱中进行的,即把淀粉葡萄糖苷酶溶液循环通过戊二醛处理过的胺烷基硅胶珠床。然后把得到的固定化酶柱在 38℃ 连续运转 70 天,以每天 250—500kg 的流速供给 30Wt% 的糊精,生成 DE 值 92—93 的糖浆。反应器系统由许多并联的柱组成,并随固定化酶活性的减退而降低通过柱的流速,以保持恒定的转化。柱的使用寿命以两个半衰期来估测,他们得出结论,即要保持生产率变动在 10% 范围内,至少需要 7 根柱。

近来 Tate 和 Lyle 公司已成功地发展了工业生产上可用的固定化淀粉葡萄糖苷酶,其主要优点是高容积活性。这样可采用高物流通过量,因此所需的工厂规模比用可溶酶的小得多(图 3.4)。淀粉葡萄糖苷酶是以酶活性蛋白的凝胶形式固定化的,是在作为酶凝胶惰性机械支持物骨炭的存在下,同时用丙酮沉淀和戊二醛交联来进行的(Daniels 和 Farmer,

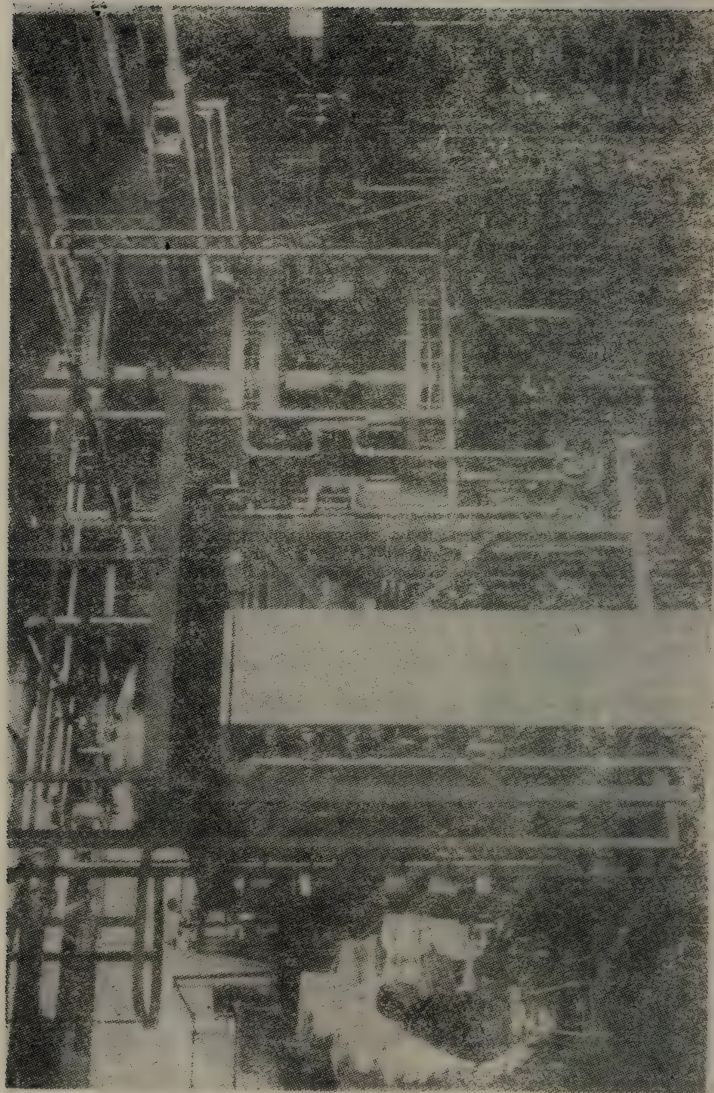


图 3.4 由 Tate 和 Lyle, Plc 生产的工业化规模固定化淀粉葡萄糖苷酶系统。

1981)。此法已成功地放大到大规模过程,而且已开始在美国玉米加工厂中工业化应用。

此外,还发现固定化淀粉葡萄糖苷酶在以下两方面也有用途,即糖化果糖浆层析分离所得的低聚合度的多糖物流,以提高果糖含量 (Poulsen 等, 1980);在用碱异构化麦芽糖后,水解掉残留的麦芽糖分子 (Walon, 1980)。

3.14.4 麦芽糖浆

现在生产两种主要类型的麦芽糖浆 (表 3.9), 一种含有 30—50% 麦芽糖和 6—10% 葡萄糖, DE 值为 42—49。这种类型的产品用在果酱和糖果中, 因为它抗颜色生成, 不吸湿, 又不像葡萄糖那样容易结晶。第二种类型的产品含 30—40% 麦芽糖和 30—50% 葡萄糖, DE 值为 63—70。它的发酵糖含量高, 贮存时稳定, 所以用于酿制啤酒和制面包 (Maeda 和 Tsao, 1979), 有时称为酿啤酒添加剂 (brewers adjunct)。

黑曲霉和米曲霉产生的真菌 α -淀粉酶比细菌 α -淀粉酶的热稳定性差, 但使用却很广泛, 这是因为它们从液化淀粉产生大量麦芽糖和麦芽三糖。此酶通过水解直链淀粉或支链淀粉链的非还原性末端的倒数第 2 个 α -1, 4 糖苷键而起作用, 依次释放出麦芽糖单位, 直到酶的作用受到 α -1, 6 键限制为止。在酶浓度、底物浓度和保温时间之间的通常关系条件下, 搅拌罐中可形成含有约 50% 的麦芽糖, DE 值为 10—20 的糖浆。在 80—85℃ 下用酶热变性的方法结束此过程。如要完全把淀粉水解成麦芽糖, 需要添加苗霉多糖酶之类的酶。

β -淀粉酶 (EC3.2.1.2) 广泛分布于高等植物, 特别是大麦和大豆中。这是一种会受巯基试剂抑制的外切酶, 水解淀粉产生 β -麦芽糖, 其最适作用 pH 为 6.5—7.0。 β -淀粉酶对

α -1,6 键无活性,所以不能完全水解淀粉分子中的支链淀粉。这样在与用酸升温液化,或用细菌 α -淀粉酶液化的淀粉一起保温时,可生产含 80% 麦芽糖和 20% 糊精的糖浆。

表 3.9 葡萄糖浆的成分

样 品	DE	糖(以碳水化合物为基准)(%)						
		DP ^a 1	DP 2	DP 3	DP 4	DP 5	DP 6	DP 7
玉米糖浆 AC ^b	27	9	9	8	7	7	6	54
玉米糖浆 AC	36	14	12	10	9	8	7	40
玉米糖浆 AC	42	20	14	12	9	8	7	30
玉米糖浆 AC	55	31	18	12	10	7	5	17
玉米糖浆 HM,DC	43	8	40	15	7	2	2	26
玉米糖浆 HM,DC	49	9	52	15	1	2	2	19
玉米糖浆 DC	65	39	31	7	5	4	3	11
玉米糖浆 DC	70	47	27	5	5	4	3	9
玉米糖浆 DC,E	95	92	4	1	1	DP5,6,7 合 计		

a. DP = 聚合度

b. AC = 酸转化, DC = 双重转化(酸-酶), HM = 高麦芽糖, E = 酶转化。引自 Maeda 和 Tsao (1979)。

麦芽糖浆可用真菌 α -淀粉酶,或植物或微生物 α -淀粉酶来制造,但只是低 DE 值的,为的是减少以后生成的麦芽三糖量。后来用麦芽的 α -淀粉酶和 β -淀粉酶生成麦芽糖,再把糖浆加热使酶失活,澄清和脱色后蒸发浓缩。大麦和大豆的 β -淀粉酶已广泛应用,但因为这种酶比较贵,微生物酶的应用正在逐渐增加。遗憾的是 β -淀粉酶不能作用淀粉的 α -1,6 键,因此形成 β -界限糊精,最后的麦芽糖含量限于 60%。为此,有人建议 β -淀粉酶和霉菌多糖酶之类的脱支酶合用。

也可把淀粉葡萄糖苷酶和真菌 α -淀粉酶合用制得高转

化糖浆,这种糖浆通常含有 30—35% 葡萄糖和 40—45% 麦芽糖。这是因为这两种酶有相同的最适作用 pH。这种糖浆使用广泛,而且在低温和高固形物浓度下也不会结晶。

微生物中也发现有 β -淀粉酶,例如巨大芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌等都产 β -淀粉酶。这些微生物酶比植物酶便宜,来源较丰富等,是其潜在的优点。

一个有重要前景的发现是芽孢杆菌的某些种能同时形成 β -淀粉酶和 α -1,6 葡萄糖苷酶。在以前这两种菌不得不分开培养,又因为两种酶所需要的 pH 和温度不同,难于同时把两种酶作用于淀粉,这样就需用两道工序来制造麦芽糖。培养基中加 Mn^{2+} ,明显促进 α -1,6 葡萄糖苷酶的形成,但 Mn^{2+} 却有抑制 β -淀粉酶形成的趋势,因此添加 Mn^{2+} 的时间和量必须仔细选择。这些酶是胞外酶,可用无机盐或有机溶剂沉淀,还可用淀粉、活性炭、硅藻土吸附分离。现已从枯草芽孢杆菌中分离到一种在碱性条件下作用,并在有螯合剂时仍稳定的 β -淀粉酶 (Boyer 和 Ingle, 1977),还从链霉菌中得到一种最适 pH 酸性的 β -淀粉酶 (Koaze 等, 1975)。

有人建议用固定化双酶系统生产麦芽糖浆 (Martensson, 1974),例如,把 β -淀粉酶和茁霉多糖酶一起固定在丙烯酰胺和丙烯酸的交联共聚物上。因为这两种酶接连作用于同一种底物,可预计共固定化系统会有明显有利的微环境效应。与可溶酶相比,还发现这系统的操作稳定性提高。

用吸附到活性炭上的方法,把 β -淀粉酶和 α -1,6 糖苷酶一起固定化。这两种酶都得自蜡状芽孢杆菌。此固定化双酶系统在 50℃ 下水解淀粉,得到含 95.5% 麦芽糖、7.5% 麦芽三糖、2% 其他寡糖的产物 (Takasaki 和 Takahara, 1976)。

3.14.5 葡糖异构酶 (EC5.3.1.5)

葡萄糖的甜度几乎只有同样重量蔗糖的 65%。果糖的甜度,因测试的条件不同而有所不同,常为蔗糖的 120—180%。这样用一种方法把葡萄糖转化成果糖就可增加甜度,从而提高它的价值。在玉米淀粉丰富的情况下,葡萄糖是容易得到的,而且很便宜。用碱异构化是可以的,但是产生过深的颜色,并生成过多的副产物。已发现 D-木糖酮基异构酶也异构化高浓度的葡萄糖,目前,所有高果糖玉米糖浆(高果糖浆, HFCS)都是用这种酶来生产的,这是当今世界上用量最大的固定化酶,每年要生产数百万吨产品。HFCS 的商品化,彻底改变了美国碳水化合物甜味剂市场,在美国 HFCS 取得了许多以前由蔗糖浆占有的市场。1977 年以来,欧洲经济共同体国家建的厂,采取了高进口税保护共同体内部甜菜糖生产。

Marshall 和 Kooi (1957) 首先记述了葡糖异构酶。葡糖异构酶很适合于以固定化形式使用。它是胞内酶,具有在足以抑制微生物污染的温度条件下稳定,以及反应物都是小分子,没有什么扩散问题等优点。以硫酸镁形式提供的微量的镁是活化酶所必需的。钙离子会与镁离子竞争,因此镁离子要过量约 20 倍。锰离子是木糖异构化所需的,而钴离子是异构化木糖和葡萄糖所需的。钴离子紧紧与酶结合,并不一定要加在底物中。

异构化过程中副产物的形成与反应 pH、反应温度、反应时间直接相关,使用固定化酶柱后,所需要的接触时间要短得多;与批式反应相比,生色就大大减少,特别是与用可溶酶生成的早期产物相比更为明显。早期产物采用批式过程,要达到完全异构化,必须在微碱条件下保持相当长的一段时间。

用来固定化葡萄糖异构酶的途径不少,类型也不同,可用完整细胞或无细胞制剂(见表 3.10)。最早的固定化尝试是采用链霉菌的酶,部分纯化并吸附到 DEAE 纤维素上。首次工业化工艺过程(1974 年)是批式操作的。以后,固定化葡萄糖异构酶制剂的机械性能得到改进提高,可以采用填充床反应器(表 3.11)。通常至少把 8 个填充床反应器并联使用,以保持稳定的总产率。批式过程中,反应条件并非最适,因为在长的反应期内,会形成过多的颜色和副产物。在填充床工艺中,反应时间较短,可采用最适异构化条件,生成较纯的产物。特别要指出的是,用过的固定化细胞可作为牛饲料。以后建立的工厂是把芽孢杆菌、链霉菌、游动放线菌或节杆菌的全细胞一起包在具有良好水合特性而又稳定的颗粒内。这些制剂是采用包括絮凝、热处理、戊二醛或类似试剂交联等多种方法制备的(Bucke 和 Wiseman, 1981)。目前所使用的大宗高果葡糖浆是采用 Novo 公司的凝结芽孢杆菌完整细胞制剂生产的,这种制剂已用于美国的一些工厂,也用于欧洲、日本和南朝鲜的一些工厂,设计容量可达 1 200 吨干重(以干物计)。这些工厂的总容量估计每年达几百万吨。

与凝结芽孢杆菌细胞相连的葡萄糖异构酶是用离心机从培养基中分离出来,经戊二醛交联后破成小颗粒并干燥,以提高颗粒的机械强度。其他可采用的方法包括:干燥前冷冻交联好的沉淀物;交联前让离心所得的细胞自溶,絮凝并干燥,或在细胞破碎后把匀浆絮凝和交联。然后把固定化酶用于柱反应器,在约 60℃ 反应,产生含约 42—43%(w/w) 果糖的糖浆,这种果糖浆颜色浅,阿洛酮糖含量低(Amotz 等, 1976)(图 3.2)。

Gist Brocades 公司采用密苏里流动放线菌(*Actinoplanes missouriensis*)菌株。细胞在玉米浆和无机盐液体培养基中,

表 3.10 用于工业化开发葡糖异构酶的固定化方法

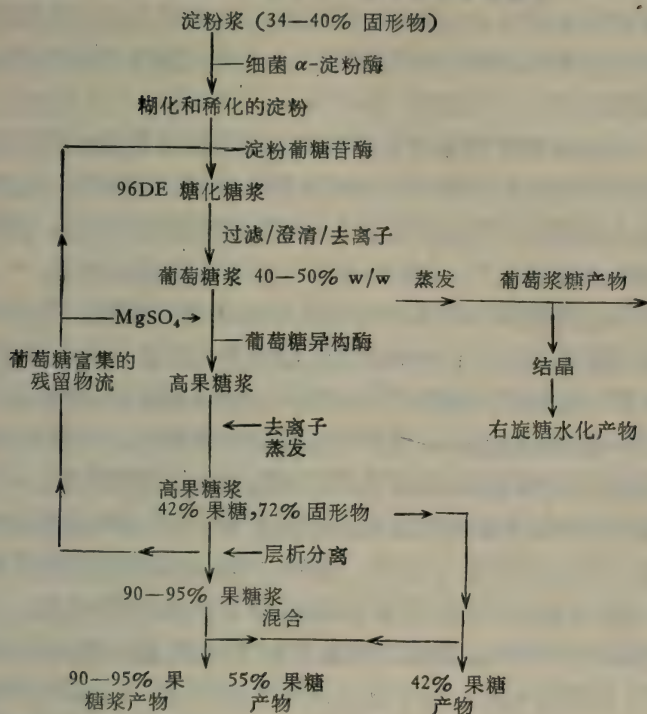
公 司	固定化方法 ^a
Novo Industry	凝结芽孢杆菌细胞,自溶,用戊二醛交联并造粒
[C] Americas Inc	节杆菌细胞,絮凝、加热,然后造粒
Gist-Brocades	密苏里游动放线菌细胞,包埋进明胶中,用戊二醛交联并造粒
Clinton Corn Processing Co	酶提取物,吸附到离子交换树脂上
Miles Labs. Inc.	细胞,用戊二醛交联并造粒
Miles Kali-Chemie	细胞,交联,然后造粒
CPC Int. Inc	酶提取物,吸附到粒状陶瓷载体上
Sanmatsu	酶,吸附到离子交换树脂上
Snam Progetti	细胞,包埋在醋酸纤维素纤维中

a. 除非另有说明,均用链霉菌一些种的细胞。

用糖蜜作唯一碳源可提高酶的产率。把这种菌丝固定的酶包埋在明胶中,并用戊二醛交联。选用这种固定化酶系是由于载体材料和偶联试剂允许用于食品中或可作为食品添加剂的。固定化作用的整个过程是连续的,而且适用于食品加工的其他酶。此酶制剂由均匀的直径为 1mm 的球形颗粒组成。据报道,这种固定化酶制剂的半衰期,在有钴存在的批式过程中为 430 小时,在无钴的柱操作过程中为 500 小时。

R. J. Reynolds 烟草公司用节杆菌的一菌株生产葡糖异构酶。在用于固定床反应器之前,将细胞聚集并进一步加工(美国专利 3645848, 1972)。Baxter 实验室的工艺过程是基于暗绛红链霉菌(*Streptomyces phaeochromogenes*)的酶,即将酶固定在阴离子交换纤维素载体上(英国专利 1274158, 1972)。这个生产领域的先驱之一的 Clinton 玉米制品公司,于 1972 年推出基于固定化葡糖异构酶(从链霉菌分离到的)的工业化生产过程(Thompson 等, 1974)。这是把酶吸附到 DEAE-纤维素上并用于计算机控制的连续过程。反应

表 3.11 从淀粉生产葡萄糖和高果糖浆



器由几个串联的浅床组成，每个床中装有使用了不同时期的材料。异构化在 60℃ pH 7.0—7.5 下进行，底物为含 30—35% 固形物的 73% 的葡萄糖液，产物含有 42% 果糖。

此外，还可从棒杆菌、丝膜菌 (*Curtobacterium*)、脂肪嗜热芽孢杆菌、树状黄杆菌等菌中获得葡糖异构酶，而树状黄杆菌与其他菌不一样，因为把细胞培养在乳糖中可得最高酶活性。

可列入固定化葡糖异构酶制剂的名单远不止这些，例如，纯葡糖异构酶已固定在 DEAE 纤维素、多孔玻璃、苯甲醛树脂上，还包埋在纤维素纤维和中空纤维中。带有异构

酶活性的完整细胞也已被包埋在聚丙烯酰胺和胶原蛋白膜及醋酸纤维素纤维中。但是这些制剂中的多数作为工业催化剂来使用的潜力似乎是较为有限的，特别是因为前面提到的不少过程已经占有了市场 (Brodelius, 1978)。

现在有回复到采用部分纯化的可溶酶固定到具有良好激流特性的稳定的无机载体上制成固定化制剂的倾向。这些制剂较高的成本，可为提高达 10 倍的容积活性所抵销，这样可用于较密集的工厂，从而降低了工艺过程的基建费用。

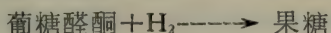
虽说葡糖异构酶取得了令人振奋的商业成就，但仍有改进提高的余地。不为钙抑制的葡糖异构酶会找到现成的市场，因为所有的精炼均可以留待酶过程后进行，这样至少可省掉一次精炼步骤。现在所用的葡糖异构酶，在 55—60℃ 下运转令人满意，热稳定性更好的酶当然会受到欢迎。此外，能在 pH7 以下运转的酶也会受到欢迎，这样就可减弱由于果糖破坏所造成的颜色变深。看来，在提高高果糖浆的果糖含量上是无能为力了。反应平衡时，产物约含 55% 果糖。在生产实践中，要把反应进行到高于 42% 果糖是不经济的，因含 42% 果糖的糖浆，按干物计是与蔗糖“等甜”的，只有用在可乐等类酸性饮料时甜度才要求更高。在这类饮料中，果糖的甜度显得低一些，需用 55% 的果糖浆代替蔗糖用于可乐型饮料中。现在采用的色层分离器，用这种糖浆生产果糖富集物流 (≈95% 果糖) 和葡萄糖富集“残液”。前者再与原料糖浆 (42% 果糖) 混合，以增加原料糖浆的果糖含量，葡萄糖“残液”可循环使用。同样，还可制造出 95% 果糖 (Buck 和 Wiseman, 1981)。在此特别要提到，葡萄糖和寡糖富集的“残液”是由分离器产生的，它可在再异构化之前用淀粉葡萄糖苷酶进一步糖化 (表 3.11)。

目前正在发展许多种葡糖异构酶的新型改良种类。例

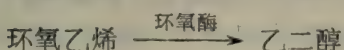
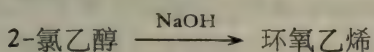
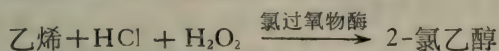
如, Miles Lab. Inc. (Elkhart, In., USA) 生产新型固定化葡萄糖异构酶, 采用热处理树状黄杆菌细胞, 再用聚乙烯亚胺、脱乙酰壳多糖、戊二醛交联, 成型后干燥制成的。这样制成的固定化酶具有广作用 pH 范围 (pH6.0—8.5), 对重金属的抑制不敏感, 60℃ 用 40% 葡萄糖浆生产 42% 果糖时, 其半衰期为 58 天。生产 42% 果糖的初活力为 2.0—2.5 空柱容积/h, 这大约要比现有工业生产的固定化异构酶活性高一倍。

除了用葡萄糖异构酶法生产高果糖浆外, 已有人作了两种很有意思的制高果糖浆的尝试。Heady (1980) 发明了一种方法, 使用果糖基转移酶、蔗糖 6-果糖基转移酶将从蔗糖得到的果糖聚合成果聚糖。将此聚合物用稀酸或酸性离子交换树脂处理, 降解成含 66—75% 果糖的果糖浆。然后把残留的葡萄糖再用葡萄糖异构酶异构成果糖, 以提高果糖的产率, 或者把残留的葡萄糖发酵成乙醇。

第二种过程使用了葡萄糖-2-氧化酶 (EC 1.1.3.10), 这种酶来自担子菌, 它可将葡萄糖氧化成葡二糖醛酮, 再催化加氢产生果糖:



此方法的突出特点, 在于作为副产物产生的过氧化氢, 可使烯烃氧化成环氧化物和乙二醇, 即:



用乙酰亚胺修饰赖氨酸残基可显著提高 2-氧化酶的热稳定性。

3.14.6 蔗糖转化

蔗糖可用酸或酶(转化酶 EC3.2.1.26) 水解成转化糖。此产物由 1:1 混合的葡萄糖和果糖组成, 而且比蔗糖甜些。它主要用于食品和糖果等产品中作为保湿剂, 以保持湿度, 防止干燥。还可使用菊粉酶和转化酶, 这些酶通常来自曲霉属或酵母属的一些种, 而且主要是与细胞壁相结合。转化糖的应用包括人造蜂蜜、酿制啤酒、制果酱(因它比蔗糖不易结晶)、回收糖果碎屑, 制糖果液体核心(这是一种含有转化酶的硬蔗糖心包上巧克力外层)。

转化酶(β -呋喃果糖酶)产生的糖浆比酸水解蔗糖所得糖浆纯度高。虽然用可溶转化酶生产转化糖是较便宜的, 但也试图把酶固定化以连续生产转化糖浆。转化酶比较稳定, 尤其是在高浓度的蔗糖中使用时更稳定。固定化后可得到半衰期非常长的制剂, 例如, 把酵母转化酶包埋进三醋酸纤维素纤维中。已发现这种固定化形式的酶, 在操作条件下有令人满意的活性和稳定性, 特别在高蔗糖浓度下, 这时游离酶显出严重的底物抑制, 这种抑制与底物的水活性减退有关。由此得出结论, 观察到的游离转化酶和包埋的转化酶间的差别是由扩散效应引起的(Marconi 等, 1974)。

3.14.7 糖炼制

3.14.7.1 棉籽糖酶

棉籽糖是一种 α -半乳糖苷, 它积累在甜菜中, 特别在寒冷气候条件下积累更多。它妨碍蔗糖从甜菜糖蜜中结晶出来。用 α -半乳糖苷酶(EC3.2.1.22) 水解棉籽糖可增加蔗糖的产率。这种增加, 部分是由于水解棉籽糖后确实形成蔗糖, 部分是去掉了糖蜜形成剂。现已证实, 葡萄酒色被孢霉是利用

棉子糖变种最好的酶源,主要因为它不产生转化酶。在受控条件下培养,会产生含 α -半乳糖苷酶的均一 (20—30 目) 的菌丝体小团。这些小团以固定化半乳糖苷酶制剂的形式很方便地用于连续过程。

日本 Hokkaido 制糖有限公司,在 1968 年介绍了与小菌丝团结合的 α -半乳糖苷酶的工业化工艺(Obara 等,1976/7)。美国 Great Western 制糖公司也设计了一种类似的工艺,并且在 1974 年开始生产。酶反应器由许多 U 形敞口容器组成,每个容器配备有搅拌,顶部有可更换的筛网用于从产物流中去掉催化剂。反应器中要处理的糖蜜不断调到 $\approx 30\%$ (w/w),温度为 48—52℃,用硫酸控制 pH 在 5.0—5.2。 α -半乳糖苷酶反应的最适 pH 是 4.0,但此过程的 pH 却保持在 5.2,为的是避免酸催化转化蔗糖。反应时间为 1.5—5 小时,如果需要处理棉子糖含量较高的糖蜜,反应时间可延长,这不会有什么困难。含酶小菌丝团使用约 25 天后丢弃。自从引入酶工艺以来,甜菜加工能力约增加 10%,得到的蔗糖增加 3%,而糖蜜生成量相应减少。

也可用戊二醛把葡萄酒色被孢霉利用棉子糖变种 (*Morriella vinacea* var. *raffinoutilizer*) 的酶,在胞内变成不溶的。在批式反应器中,含有棉子糖的甜菜糖液,在 50℃ 下用这种细胞处理。在循环使用 250 多批(时间在 3 周以上)处理过的细胞还有 72% 的初活性,而未经处理的细胞只留下约 5% 的活性 (Saimura 等,1975)。

此外,还使用了蝇卷霉 (*Circinella muscari*)、犁头霉 (*Absidia griseola*)、脂肪嗜热芽孢杆菌和黑曲霉的 α -半乳糖苷酶。黑曲霉的 α -半乳糖苷酶用于水解豆浆和油料植物种子中的蜜二糖和棉子糖等中的 α -半乳糖苷。

3.14.7.2 α -淀粉酶

α -淀粉酶在炼制蔗糖中偶尔有用处,因为甘蔗中可能有少量淀粉存在。这些淀粉在蒸发前可用地衣形芽孢杆菌的 α -淀粉酶水解掉。这过程中非常重要是不发生蔗糖转化。

3.14.8 葡聚糖酶 (EC 3.2.1.11)

葡聚糖是由明串珠菌 (*Leuconostoc*) 生成的 α -1, 6 连接的葡萄糖聚合物,这些菌生长在受机械损伤的甘蔗中。在 $\cong 50-60^{\circ}\text{C}$ pH4.5—6.0 下,葡聚糖酶 (1,6 α -葡聚糖-6-葡聚糖水解酶)把这种聚合物降解为异麦芽糖和异麦芽三糖,这样防止蔗汁的粘度增高,因为粘度增高会使蔗汁澄清和蒸发结晶出蔗糖发生困难。也有人建议,把葡聚糖酶作为牙膏的一种成分,通过溶解口腔细菌产生的葡聚糖,有助于防止龋齿发生。葡聚糖酶还可用来生产代血浆的葡聚糖。防治龋齿的葡聚糖酶是由串珠镰孢生成的,这种酶对羟基磷灰石具有高亲和力。膝黄青霉、淡紫青霉、绳状青霉、产气克雷伯氏菌、串珠镰孢、黄杆菌等菌产生内切葡聚糖酶。外切葡聚糖酶则是由凝结芽孢杆菌和球状节杆菌 (*Anthobacter globiformis*) 产生的。

3.14.9 脱支酶

某些酶专门作用液化淀粉中支链淀粉上的 α -1, 6 键。从淀粉产生麦芽糖和麦芽三糖。这些酶是茁霉多糖酶和异淀粉酶。茁霉多糖酶 (EC 3.2.1.4) 更确切的名称是茁霉多糖-6-葡聚糖水解酶,这种酶水解直链的多糖,茁霉多糖。肺炎克雷伯氏菌是茁霉多糖酶工业化生产的酶源,在菌生长时分泌出这种酶,但有一部分酶看来是细胞结合的。用支链淀粉含量

高的淀粉作诱导酶的底物。此外，枯草芽孢杆菌和产气气杆菌也产这种酶。克雷伯氏菌的酶至少是由三种不同分子量的同工酶组成，它们可通过蛋白质水解而相互转化。最为人们所熟悉的工业化应用是用于啤酒酿造。

近来，Novo 公司已发展出一种酸性解茁霉多糖芽孢杆菌 (*Bacillus acidopullulyticus*) 产生的，类似于茁霉多糖酶的脱支酶 (Nielson 等, 1982)。这样看来，有可能把这种新型茁霉多糖酶与葡萄糖淀粉酶在两种酶都是最适的条件下一起使用，以便生产 $DE > 96$ 的葡萄糖浆，而不必过度稀释底物或者使用大量葡萄糖淀粉酶。另一种潜在的用途是与 β -淀粉酶一起使用，生产高麦芽糖类产物。

另外一些不水解茁霉多糖，仅限于作用 α -界限糊精的脱支酶，也归在异淀粉酶类中。这种酶可从黄杆菌和假单胞菌 (*Pseudomonas deramosa*) 获得，这种酶仅作用位于分支点的 α -1,6 键，而不作用于像茁霉多糖那样的直链上的 α -1,6 键。

3.14.10 环状糊精葡萄糖基转移酶和其他淀粉酶

环状糊精葡萄糖基转移酶从淀粉生成圆形环状糊精。它们由 6,7 或 8 个葡萄糖单位组成(分别称为 α 、 β 和 γ 环糊精)。它也可把淀粉上的葡萄糖转到蔗糖上的葡萄糖残基上。这种酶来源于嗜碱的浸麻芽孢杆菌 (*Bacillus macerans*)、脂肪嗜热芽孢杆菌或巨大芽孢杆菌，从巨大芽孢杆菌所得酶倾向于只产 β -环状糊精 (Shiosaka, 1976)。这种酶是胞外的，并可用吸附在淀粉上的方法纯化。浸麻芽孢杆菌的酶已用于生产含果糖的糊精，这是用 $DE 10$ 以上的淀粉水解物与蔗糖或转化糖通过转葡萄糖基作用生产的。 β -环状糊精的生产最便宜，生产量也最大，这是因为它比 α -和 γ -环状糊精的溶解度

小得多,容易从溶液中沉淀出来,便于生产,产率也高。不久前, Kato 和 Hori koshi (1984) 已把环状糊精葡萄糖基转移酶固定化。施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*) 产生一种外切淀粉酶,它能把淀粉水解成麦芽己糖。另一种外切淀粉酶也把淀粉水解成麦芽己糖 (Robyt 和 Ackerman, 1971)。肺炎克雷伯氏菌也产生类似的外切淀粉酶 (Kainama 等, 1972), 而从地衣形芽孢杆菌得到的另一种酶产生的绝大部分是麦芽戊糖 (Saito, 1973)。黑曲霉的一些种类产的异茁霉多糖酶把茁霉多糖降解成异 6- α -葡糖基麦芽糖 (Sakano 等, 1972)。

可以用酶成功地去掉一种高甜度的甜味剂史蒂维奥苷 (stevioside) 的苦味, 这是采用葡聚糖-蔗糖酶、 α -淀粉酶或 α -葡糖苷酶等葡糖基转移酶, 把葡萄糖从淀粉或蔗糖中转移出来, 生成 α -葡糖基史蒂维奥苷 (Kaisha 等, 1980)。

3.14.11 纤维素酶 (EC 3. 2. 1.4)

用酶把纤维素水解成葡萄糖是酶工程最令人鼓舞的新进展之一。纤维素是最丰富的有机物, 与其他一些有潜力的能源不同, 它可以再生。每年从稻草、麦杆、锯木屑等形式出现的数量极多的纤维素废弃物, 开发出简单、有效、经济的工艺过程, 把这样的废弃纤维素转化成葡萄糖是全世界所关注的。用这样的办法生产的葡萄糖可作甜味剂, 也可作单细胞蛋白生产的能源, 或转化成乙醇之类有价值的化工产品。纤维素酶(例如, 来自绿色木霉的)催化纤维素水解。纤维素酶是几种具有不同水解活性的酶的复杂混合物, 它是用2-葡糖- β -葡糖苷 (sophorose) 作诱导剂, 以半固体发酵或深层发酵制备的。

纤维素酶作用纤维素的方式至今了解得不太清楚。现在

所知道的是纤维素酶复合物含有几种内切- β -1, 4-葡聚糖酶(图 3.5), 其中之一可能是首先作用纤维素的酶。这种酶与外切- β -1, 4-葡聚纤维二糖水解酶协同作用。此外, 酶系统中包括一种外切- β -1, 4-葡聚葡萄糖水解酶和纤维素酶。要达到最适水解必需有几种酶协同作用。大多数纤维素酶是分子量为 40 000—75 000 的糖蛋白, 有一种内葡聚糖酶的分子量为 12 000。

2-葡糖- β -糖苷诱导绿色木霉的纤维素酶系, 而葡萄糖却阻遏这种酶系。在 pH4 以下, 纤维二糖酶的活性不稳定。此酶在纤维素水解生产葡萄糖的过程中是重要的, 水解纤维二糖具有减少这种糖的终产物抑制作用。

已研究过的其他纤维素酶包括从木材腐败菌粉状侧孢 (*Sporotrichum pulverulentum*) 得到的酶类。嗜热菌的酶类, 例如嗜热侧孢 (*Sporotrichum thermophilic*)、嗜热毛壳 (*Chaetomium thermophilic*)、弯曲高温单孢菌 (*Thermomomspora curvata*)、梭菌和气杆菌的纤维素酶的最适作用温度, 分别为 45, 77, 65, 67 和 50℃。非常有趣的例子是黄灰色链霉菌 (*Streptomyces flavogriseus*), 它能同时产纤维素酶和一种葡糖异构酶 (Huepfel 等, 1980)。读者可参阅 Ryu 和 Mandels (1980) 以及 Enari (1983) 的全面综述。

目前纤维素酶的工业应用规模不大, 其中包括作助消化剂、降解大蒜、蘑菇等食品及家庭废弃物中的纤维素。又如用某些纤维素酶中夹杂的半纤维素酶降解面粉中的戊聚糖, 可改善烘烤质量。同样, 市售果胶酶中夹杂的半纤维素酶, 在液体咖啡制备中也用来液化粘稠物质。市场上可买到的半纤维素酶制剂是从曲霉的一些种获得的, 这些制剂中还含有木聚糖酶、甘露聚糖酶、阿拉伯呋喃糖酶等酶。Gist-Brocades 出售一种处理牛饲料(青贮饲料)用的枯草芽孢杆菌和米曲霉来

源的多酶混合物。

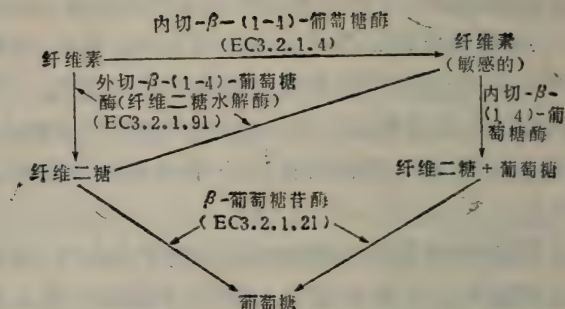


图 3.5 纤维素酶在纤维素-纤维素酶系统中的作用方式
(Ryu 和 Mandels, 1980)。

3.14.12 乙醇发酵

从玉米、马铃薯、大麦、木薯或其他来源得到的淀粉，在用酵母或其他菌发酵成食用或非食用乙醇之前，必须用一些水解酶预处理，进行液化和糖化。这些水解酶有 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶。可用加入麦芽（发芽大麦）来提供这些酶，可是花费很大。麦芽不但含有 α -淀粉酶和 β -淀粉酶，而且还有降解界限糊精 α -1,6 键的酶。近来，通常添加细菌的酶以补足与淀粉有关的内源酶。例如，已发现在生产食用乙醇的美国批式工艺中，蒸煮阶段添加细菌 α -淀粉酶。这对部分水解糊化淀粉是有好处的，降低了粉浆的粘度，使搅拌和混合容易进行。接着把浆冷凉，再加进细菌 α -淀粉酶继续水解，最后在 55—60℃ 较低温度下加入稳定的淀粉葡萄糖苷酶以完成水解。将水解好的粉浆接种上酵母，保温，同时进行糖化和发酵，直到右旋糖消耗尽，最后把乙醇蒸出。

德国批式工艺恰好相反， α -淀粉酶是在制浆阶段加入。制浆分两阶段进行，用细菌 α -淀粉酶高温液化(80℃)，随后在

55—60℃ 用真菌 α -淀粉酶进行较低温液化。再加入淀粉葡萄糖苷酶,最后加酵母完成淀粉到乙醇的转化[见 Godfrey 和 Reichelt, 1983]。近年来,用作内燃机燃料的非食用乙醇的工业化生产增长很快,特别在巴西增长尤其迅速,是靠发酵甘蔗和木薯获得乙醇的。也有人提出用固定化细胞来发酵乙醇。走在最前面的看来是 Kyowa Hakko Kogyo Co, 此公司采用包埋在海藻酸钙小球中的酿酒酵母的柱。用未经灭菌的稀甘蔗糖蜜生产乙醇已有半年多。其生产能力为每天每千升反应器容积产 0.6 千升乙醇,产出的是 8.5% (v/v) 的乙醇,达到理论产率的 95%。自 1983 年 5 月起,两个由 10 千升反应器组成的半工业化工厂已投入生产。开发的另一项新技术是用含水两相系统直接将淀粉转化成葡萄糖和乙醇 (Mattiasson 和 Larsson, 1984)。

3.14.13 啤酒酿造

在啤酒酿造过程中,制浆和调理 (conditioning) 两阶段使用酶(图 3.6)。在制浆阶段,把蛋白酶、霉菌多糖酶、 α -淀粉酶、 β -葡聚糖酶等酶加到麦芽中,麦芽要粉碎得细,以增进吸水 and 酶的透入,碎麦芽与麦芽提取物及添加的谷物和热水一起成为麦芽浆。在制浆过程中,用酶降解大麦中的淀粉,生成甜麦芽汁。这样产生可发酵糖和界限糊精,后者是一种不能发酵的产物,而且会存在于制成的啤酒中,增加啤酒的热卡值。 β -葡聚糖酶 (EC3.2.1.6) 得自枯草芽孢杆菌、淀粉液化芽孢杆菌或黑曲霉,它降解使麦芽汁粘度增高的 β -葡聚糖聚合物(大麦胶)。这种胶状物的存在使加工发生困难,特别是难过滤。使用微生物酶,可使 β -葡聚糖水解到相当程度,因为微生物酶是热稳定的,在制浆后有些酶活性仍存在,在以后的加工中仍发生作用(需要指出, β -葡聚糖酶的这种作用在

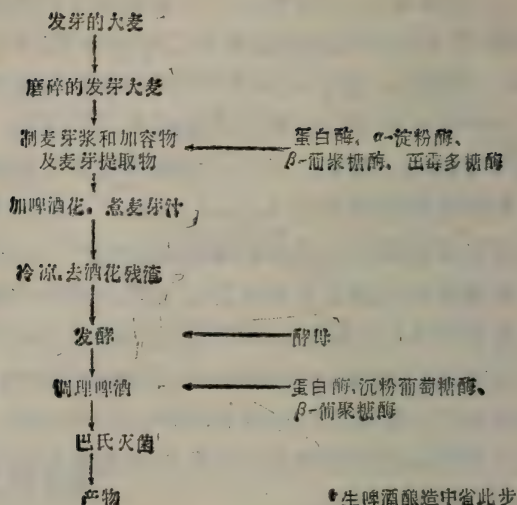


图 3.6 啤酒制造主要操作流程图中。

鸡饲料的制备中也得到利用，因为小鸡消化不了 β -葡聚糖，而且 β -葡聚糖包裹在可代谢的材料外面，还会降低这些材料的营养价值）。

在浸泡麦芽浆时，温度恒定在约 65°C ，使用尽可能浓的麦芽浆可稳定酶，而在煎熬浆时温度逐渐升高，这有利于稳定性更好的蛋白酶、 β -葡聚糖酶和 β -淀粉酶的活性。制浆的温度会影响残留糊精量，在稍低的温度下，可发酵糖的比例就高。制备麦芽后残留的所有淀粉颗粒都是抗酶糖化的，大概是由于有聚合材料包复层存在的原因。

随后把啤酒花加入经煮沸酶失活的麦芽汁中。木瓜蛋白酶是最常用来降解使啤酒混浊的蛋白质组分的蛋白酶（浊雾是一种多酚、碳水化合物和蛋白质的复合物），防止了啤酒的冷混浊，延长了啤酒的货架寿命。木瓜蛋白酶处理是在 4°C

下进行 3—4 天,而且必须加以控制,因为过度的蛋白质水解会影响啤酒的泡沫和其他质量。防止啤酒冷混浊的另一种酶是黑曲霉产生的鞣酸酶,这种酶降解浊雾的多酚成分(Beck 和 Scott, 1974)。还有人提议用它作为速溶茶中溶解固形物的手段(Scott, 1975)。将来可能出现的一种进展是连续调理啤酒,这一步看来是适合于连续固定化酶反应器使用的。偶而在发酵期间加入淀粉葡萄糖苷酶。这样所产生的碳水化合物的组成和比例会改变,大约会有更多的可利用的葡萄糖(Pfisterer 和 Wagner, 1975)。但是淀粉葡萄糖苷酶往往是用在发酵以后的工艺过程中。在这种情况下,加入淀粉葡萄糖苷酶是为了降解残留的糊精,以保证啤酒的最高乙醇含量,并不必用添加浓糖液来增加啤酒甜度,或生产出可同化糖含量低的啤酒。这种低糖啤酒糖尿病患者可以饮用(Woodward 和 Bennett, 1973)。在酿制鲜啤酒中不加淀粉葡萄糖苷酶,因为这种啤酒不经过巴氏灭菌,这种酶继续存在于啤酒中是没有好处的。在熟啤酒酿造中,加入的蛋白酶和淀粉葡萄糖苷酶经过巴氏灭菌后在产品中部分失去活性。

固定化酶在酿造啤酒工业的其他许多过程中有潜在的用途;固定化淀粉葡萄糖苷酶已用于水解啤酒中的糊精,已有人提议,用固定化 β -葡聚糖酶帮助酵母过滤(Linko 等, 1981)。如果处理过的啤酒含有残留的酵母细胞,所产生的葡萄糖可在下一过程中被利用掉。已用不溶的淀粉葡萄糖苷酶处理全发酵的无酵母细胞的啤酒,在 5℃ 下处理 3 天,产生 0.6% 葡萄糖。这些啤酒仍然澄清,而且风味也不差。丁二酮(2,3-丁二酮)还原酶可去掉啤酒中由丁二酮引起的类似于黄油的味道,其中以与酵母细胞结合的酶(Thompson 等, 1970)和产气杆菌所产生的酶(Scott, 1975)为佳。这种经酶处理的啤酒的质量比用吸附剂处理的要好。

通过采用制糖工业发展的改良工艺过程,许多糖酵解的酶在啤酒生产中可能有用,但须以顾客能接受这些产品的风味为前提。可加入固定化微生物 α -淀粉酶以帮助增加或者甚至取代麦芽中自然存在的淀粉酶。通过固定化的 α -淀粉酶、 β -淀粉酶和淀粉葡萄糖苷酶的作用,可能生产出高发酵糖麦芽汁。此外,固定化 β -葡聚糖酶可能在调节啤酒的粘度上很有用,因为 β -葡聚糖与啤酒的粘度关系很大。所有这些潜在的应用只不过是开发的可能。现在已生产出无乙醇的啤酒类饮料,调制麦芽浆的配方与传统的含乙醇啤酒的配方相似,但添加麦芽淀粉酶和蛋白酶以提取具有较多香味的麦芽中固有成分。通常这种麦芽浆按一般方法进行发酵,然后抽真空去掉乙醇。

3.14.14 烘烤食品

传统的烘烤方法是以内源酶存在为依据,这些酶在生长、成熟和贮存过程中催化自然的变化。它们也在发酵之前进行淀粉糖化和面筋降解,而面筋降解对决定面团的流变性质是很重要的。人们已使用包括外肽酶和内肽酶在内的米曲霉蛋白酶,这些酶的热稳定性差,在烘烤过程中会失活。这样能改善面团的组织,便于加工,减少能耗。单个面包体积会显著增加,据说还有其他的改善(见下面)。

可用内源的 α -淀粉酶和 β -淀粉酶的协同作用,使颗粒研磨破裂的淀粉发生糖化, β -淀粉酶作用生成麦芽糖和界限糊精, α -淀粉酶作用生成葡萄糖、麦芽糖和含有 α -1,6 键的低分子量寡糖。它们共同作用产生可以为酵母麦芽糖酶作用的麦芽糖,而酶分解麦芽糖产生可发酵的葡萄糖并产生气体,同时通过降解淀粉和改变面团的流变性而使面团容易加工。理想的状态是有足够的酶活性,使可发酵糖的产生速率与酵

母细胞利用速率相同。

未发芽和发芽的麦粒磨出的面粉中的 β -淀粉酶的活性几乎是相同的,但未发芽的麦粒中的 α -淀粉酶的活性可能非常低,甚至在发芽的麦粒中 α -淀粉酶活性改变也很慢。它的活性高低与生长和收获的条件密切相关,因为在干燥条件下很少会出现发芽。小麦 α -淀粉酶的缺点是热稳定性较好,在烘烤过程中它仍在继续起作用,产生过量糊精,结果形成粘湿而无弹性的面包心结构。可采用过热蒸气处理来破坏面粉中的内源 α -淀粉酶,或用 α -淀粉酶含量低的面粉兑稀。 α -淀粉酶含量低会使糊精浓度降低,结果形成的气体也少,制出的面包个小质量差。通常要补加外源真菌 α -淀粉酶,特别是因为现在大多数面包生产所用的现代化的快速连续烘烤工艺,需要较高的 α -淀粉酶活性(图 3.7)。据报道,面粉中添加 α -淀粉酶,不仅加快发酵速度,降低面团粘度,从而改善产品的体积和组织,而且在面团中产生糖,从而改善面包的味道、面包皮的色泽和烤面包片的质量。

最初是以麦芽的形式添加 α -淀粉酶。现在绝大多数采用米曲霉 α -淀粉酶,这是因为麦芽 α -淀粉酶改变面包的颜色,而且蛋白酶含量较高。麦芽中的 α -淀粉酶含量也是有变化的,酶的热稳定性又比较好,有时会产出粘面包。使用微生物酶特别有利,虽说酶活性随烘烤的面团温度的升高而增加,但在 60°C 左右它就失活,这时只会有很少量的淀粉发生糊化,因此容易控制反应。而且这种酶只含很少量的蛋白酶,并有助于面团中气体的均匀分布,赋予面包良好的组织质量,增加发面体积。据说添加淀粉酶的面包色泽和货架寿命也不错。制造未发酵的产品时,不添加 α -淀粉酶,在这种情况下,面团是由面筋、低分子量糊精及比传统发酵产品含量高得多的糖所组成。这些蛋白质是持留气体以使烘烤材料具有良好

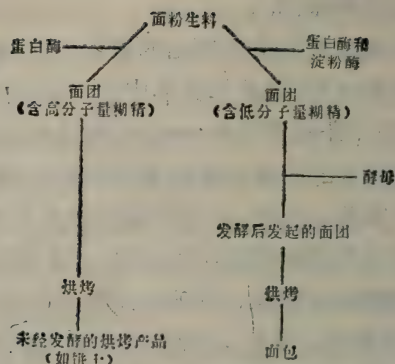


图 3.7 烘烤产品的制造。包括主要步骤的流程图：示出酶的使用。

的结构所必不可少的。小麦含有面筋，只有这类谷物用来生产烘烤产品。

在某些应用中，如在饼干制造，需要含有高分子量糊精以及含有高水解程度面筋的面粉，为的是要有足够的弹性以便于加工。许多面粉并不具备这种性质，而且只具有很低的蛋白酶活性，所以要添加蛋白酶来降解面筋。所用的酶是枯草芽孢杆菌产生的专一的热稳定内肽酶，这样得到的产物弹性增加。这一点很重要，在饼干制作过程中就可将面团铺得很薄。用酶法降解面筋要比亚硫酸氢盐等化学法好。

酶在烘烤过程中还有些次要的应用。以大豆粉形式添加的脂肪氧化酶用作漂白剂。这是在氧存在下，通过产生脂肪氢过氧化物氧化面筋，并漂白胡萝卜素等类的谷物色素而发挥作用的。产生体积大、面包心细的面包，这种最早由 Haas 和 Rohn (1934) 所记述的工艺现在仍在使用 (Emken, 1977)。此外还在酶水解小麦和黑麦粉的戊聚糖方面做过些研究，无花果曲霉 (*Aspergillus ficcum*) 的真菌植酸酶已被用于处理小麦以去掉植酸和抗营养因子 (Liener, 1977)。

3.14.15 乳制品工业

乳和由乳加工出的产品是碳水化合物、蛋白质、脂肪、矿物质和维生素的重要营养源。乳制品工业的许多加工过程中都利用酶,显然新的应用还在不断开发。

3.14.15.1 乳糖水解

最重要的新发展之一是使用固定化 β -半乳糖苷酶(乳糖酶 EC 3.2.1.23) 水解乳品中的乳糖。乳糖是哺乳动物乳中的一种双糖(牛乳固形物的40%)。乳糖比蔗糖的溶解度低,没有蔗糖甜,又不能直接为肠道吸收。乳糖酶把乳糖水解成葡萄糖和半乳糖,这样合在一起的甜度大约是蔗糖的8成,而且水解产物的溶解度要比乳糖高3—4倍,水解出来的单糖容易被肠道直接吸收。

乳糖酶存在于幼体哺乳动物的肠道中,通常在断奶期后消失,但有些人却例外。在某些微生物中也发现有这种酶。乳糖酶活性也存在于用来加工干酪的大多数乳链球菌中。

从几个方面来看,把乳糖水解成葡萄糖和半乳糖是有好处的。占世界人口相当大比例的人不能耐受乳糖,饮食乳后会引起腹泻和肠胃不适。其次,在干酪生产中产生作为副产物的乳清中含有较高浓度的乳糖。由于其中所含的双糖容易结晶出来,这种副产物的利用是有限的。因此每年要倒掉大量的乳清,这样造成废物处理问题,也丢失了有价值的营养物质。第三,乳糖是不太溶解的糖,乳清,尤其是浓缩的乳清,在贮存和运输过程中会因结晶析出而造成麻烦。

乳糖可用酸水解,但容易使颜色变深,而且会堵塞酸性离子交换树脂。用固定化 β -半乳糖苷酶酶法水解,可消除或减少这些问题。

乳糖酶工业化生产的最佳来源是乳酸酵母 (*Saccharomyces lactis*)、黑曲霉、米曲霉等霉菌以及大肠杆菌等细菌。并且已从大肠杆菌、酵母菌[或按最近命名为克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)] 的一些种和真菌制得纯乳糖酶。大肠杆菌的乳糖酶只用于分析化学。乳酵母(乳酸酵母)得到的酵母乳糖酶制剂是目前使用最广泛的商品化乳糖酶制剂。这种乳糖酶的最适加工过程条件 ($35-40^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}6.6-6.8$) 与乳的自然温度和 pH 相近,因此在处理乳和甜干酪乳清中十分有用。乳酸酵母的乳糖酶在 4°C 左右的温度下仍表现出相当的活性。在这种温度下腐败细菌的生长非常缓慢。这样乳(或乳清)就可在乳品惯用的过夜的贮存期中经受乳糖酶处理。

第二种最著名的商品化乳糖酶制剂是黑曲霉的真菌乳糖酶。它的最佳加工条件在 50°C 左右, $\text{pH}3.5-4.5$, 因此这种乳糖酶的应用只局限于酸性乳清。这两种乳糖酶均为酶解产物半乳糖所抑制,难以达到完全水解。

乳糖酶应用于下面一些范围:

不能耐受乳的人,尤其是给婴儿食用的乳。

制干酪和酸奶的乳。

生产甜味剂和可溶性水解乳清糖浆用的乳清或乳糖。

浓缩乳制品(如炼乳),以及防止用乳糖制作的冰淇淋中的粗砂糖粒生成。

工业化生产不采用批式水解的途径。但在这样的情况例外,即乳糖酶包装时加到盛装乳的容器中,在运输和贮存过程中,乳中的乳糖会发生水解。相当多的精力是用于乳糖酶的固定化上。上述来源或其他来源的 β -半乳糖苷酶在实验室中已被固定在各种载体上,这些载体除聚丙烯酰胺凝胶和三醋酸纤维素纤维外,还有无机载体、胶原、琼脂糖等。显出 β -半乳糖酶活性的完整细胞也已被固定在聚丙烯酰胺凝胶中。

酶源的选择受到制剂应用的影响,例如,黑曲霉的乳糖酶就很容易水解酸乳清中的乳糖,这种酶的最适 pH 约为 4.0。而较接近中性 pH 的其他底物例如牛奶,则用乳酸酵母和大肠杆菌的乳糖酶较合适。

上面列出的一些固定化 β -半乳糖苷酶制剂已经受大规模运转的考验,或经过中试工厂的研究。第一个中试工厂规模的乳糖水解加工过程是在 Snam Progetti 公司设在意大利米兰的一个乳品厂中进行的。先用三醋酸纤维素包埋酵母 β -半乳糖苷酶,并用来水解灭过菌的脱脂乳中的乳糖。如果进行适当的灭菌,运转 50 次,加工 1 万升牛乳后不会出现细菌污染,酶活性的损失极少,运转 50 次后只损失初活性的 9%。此外,使用高活性的纤维使水解得到明显改善,降低了纤维对牛奶的比。实际上,中试工厂的实验是很令人鼓舞的,因此在米兰建立起每天可处理 10 吨牛奶的工业化生产厂,并在 1977 年投产 (Pastore 等, 1974)。

Corning 玻璃厂 (Corning Glass Works) 发展出生产水解掉乳糖的乳清的另一种工艺并在中试工厂规模进行试验。使用一根每天处理量为 6 800 升液体乳清的柱。在乳清进入酶柱之前,用超滤去掉溶解的蛋白质。据估计,这种固定化酶的半衰期至少为 4 000 小时。也已有人把 β -半乳糖苷酶固定在氧化铝颗粒上,用于水解乳清中的乳糖,已达到中试工厂规模。此加工过程是以流化床的形式,在直径为 7.6cm 的流化床柱中运转的。在使用时会在酶颗粒上生成蛋白层,这可用超声波处理加以除去。通过示踪实验,发现达不到塞流式条件。

一般说,处理乳清的主要难题是不溶性固形物堵塞固定化酶,这需要在处理前先经超滤或离心处理。也有人尝试用连续流态化床来避开这问题 (Cheryan 等, 1975)。

3.14.15.2 干酪制造

a) 凝结

干酪制造的第一步是乳的凝结(图 3.2)。凝结可分成酶和非酶两种界限分明的阶段。在最先的酶阶段中,蛋白酶(凝乳酶或效果较差的胃蛋白酶)进行专一性的蛋白质限制水解,把 κ -酪蛋白的苯丙氨酸-甲硫氨酸键打开,使酪蛋白胶束成亚稳态。在第二个非酶阶段中,由于钙离子影响,乳凝胶化。这些反应的温度系数分别为 2 和 10—12,所以可在固定化酶反应器中用降低温度以抑制非酶阶段的办法,有选择地使牛奶凝结延缓,但可使酶阶段完成,然后加热反应器中的流出物发生絮凝。在恰当的温度和 pH 并有最适量凝乳酶的条件下进行凝结是极其重要的,以便生成坚实度适合的凝乳,使乳清极易分离出来。

粗凝乳酶 [rennet (EC 2.4.23.4) 是用皱胃(未断奶小牛的第 4 胃)的盐水提取物加工制成的,含有几种胃酶,主要的凝结乳的酶是一种酸性蛋白酶,即凝乳酶 (chemolysin) (EC 3.4.4.3)。由于粗凝乳酶比较缺少,又因为小牛肉的消费量减少,而干酪的消费量却不断增加,因此发展了来源较方便的代用品。首先发现微小毛霉产生的酶有足够高的乳凝结对总蛋白酶的比例 (Arima 等, 1968)。以后又发现米黑毛霉和寄生内座壳 (*Endothia parasitica*) 也产生乳凝结的酶 (EC 3.4.23.6) (Aunstrup, 1976), 它能在干酪制造中代替粗制凝乳酶或更专一地使乳蛋白凝结,使酪蛋白与乳清分开。这些酶与其他蛋白酶不同,而与微小毛霉的专一性相似,但又不完全相同。微小毛霉的酶可在氯化钠存在下,用热处理酶制剂的办法使纤维酶杂质失活来提高它的质量。类似的酶也可从浅白隐球酵母 (*Cryptococcus albidus*) 和其他类似的

菌中获得。这种酶是胞外的,并可用硫酸铵和有机溶剂沉淀。微生物凝结剂是非常有用的,现在全世界生产的干酪约三分之一是借助于它们来生产。其缺点是热稳定性太好,因此在工业上受到用重组体 DNA 技术生产凝乳酶的改进方法的挑战。使用去热稳定微生物粗制凝乳酶,可使乳制品中的残留酶量相似或低于用小牛粗凝乳酶加工产品中的残留酶量(Branner-Jorgensen, 1983)。在某些情况下,由于微生物酶的专一性增加,使它的作用实际上与小牛粗凝乳酶的作用难以区分。有些微生物粗制凝乳酶有助于赋予消费者熟悉的风味。

b) 风味形成

解脂酶(EC 3.1.1.3)可由许多种微生物产生,其中包括米黑毛霉、多球菌(*Myriococcum*)、曲霉、根霉和芽孢杆菌的一些种。这些制剂有脂肪酶和酯酶的活性,并用于食品工业中使干酪产生所需的风味。解脂酶水解甘油三酰酯,生成游离脂肪酸,然后脂肪酸又被转化成酮。此酶可在低 pH 下吸附到硅藻土上,然后在高 pH 下解吸使乳制品具有该种动物乳所特有的风味。还发现中性蛋白酶也能通过增加香味的生成而加速干酪成熟,而酸性和碱性蛋白酶会产生苦味(Law 和 Wigmore, 1982)。加速干酪成熟为酶在未来的乳品工业中的应用提供了主要的机会。

在干酪制作过程中,凝乳酶、胃蛋白酶和(或)微生物凝乳酶都可与乳杆菌的起始培养物一起加到乳中。酪蛋白凝结形成凝乳,把它与乳清分开并压榨。然后把蛋白酶和脂肪酶与要制成的干酪类型相适配的霉菌一起加入,以形成干酪的组织 and 风味。另一种可采用的途径是把干酪熟化酶和它们所作用的乳成分包裹在乳脂的微胶囊中,然后在制干酪前加入到巴氏灭菌过的乳中。

在干酪制作过程中使用固定化酶是有吸引力的，因为可能实现连续加工，也可再利用供不应求的乳凝结酶，从而使酶的利用更经济。第三是具有自身蛋白分解而不宜以可溶态来使用的蛋白酶，可用固定化酶形式来使用，这种形式可防止上述效应。最后，采用固定化乳凝结酶，就可使用只对干酪熟化有利的第二种蛋白酶，从而避免兼顾乳熟化活性和凝结活性。

c) 其他应用

在乳品工业中，通常用 0.05% 的 H_2O_2 对要制干酪的乳进行“冷巴氏灭菌”，在某些缺少冷冻设备的国家用此法来保存乳。在“巴氏灭菌”后，可用过氧化氢酶破坏 H_2O_2 (Ohlson 和 Richardson, 1974)。但是此法受过氧化氢酶价格高的限制，不过可用较为经济的固定化形式来利用这种酶；同时也受到过氧化氢氧化某些氨基酸，特别是甲硫氨酸而降低乳或干酪的食品价值的限制。此外还报道过，把溶菌酶添加到牛乳中以有助于牛乳的“人乳化”，人乳和牛乳的主要差别之一是它们的溶菌酶含量。

过氧化氢和硫氰酸盐是乳中自然存在的，它们会在乳过氧化物催化下氧化硫氰酸盐而生成一种抗菌剂。在乳中加入过氧化氢激活了乳过氧化物系统，从而提高了“自身巴氏灭菌”作用。特别要提到，按常规是要检测乳中的乳过氧化物酶活性的，因为这是巴氏灭菌效果的一种好指标。

在牛乳进一步利用之前，还可用青霉素酶处理，这是为了去掉用青霉素治疗来防治乳牛乳腺炎所残留在牛乳中的青霉素。因为它可能对青霉素过敏的人有害，而且还可能影响到制备干酪的微生物。

已成功地用胰蛋白酶溶解水溶性热变性干酪乳清蛋白，反应后的酶可用基于纤维素的亲和吸附剂完全回收 (Monti 和 Jost, 1978)。用胰蛋白酶处理乳也抑制了贮存时产生的

氧化味道。已有人用固定多孔玻璃上的胰蛋白酶来去掉这样的味道,而且还发现填充床反应器要比批式反应器或流化床反应器更有效。

在超高温灭菌的乳生产中,会出现有蒸煮味的同样严重的问题。这种异味与乳中蛋白质的热变性造成的巯基暴露有关。现已从乳中分离到具有广底物专一性的巯基氧化酶,并把它固定多孔玻璃上,为的是再氧化这些巯基(可见 Swaisgood, 1977, 1978, 1980 年的综述)。

最后要特别提到,脂肪酶以类似于干酪风味形成的方式用于黄油制品风味的产生,蜡状芽孢杆菌的乳链球菌肽酶用于去掉干酪制品中产生的或者外加的多肽抗生素乳酸链球菌肽。

3.14.16 有机酸

α -酮酸可用于治疗慢性尿毒症。 α -酮酸通常难用化学法合成,而且氧化酶又昂贵,因此有人提出用固定化酶来进行合成。

阳光遮蔽剂尿刊酸是以 L-组氨酸为原料,使用包埋进聚丙烯酰胺凝胶的 L-组氨酸裂合酶[如来自无色杆菌 (*Achromobacter liquidian*)] 催化而生产的。采用 70°C 热处理制剂以使催化尿刊酸降解的尿刊酸酶变性。看来,制备过程和(或)固定化会使细胞溶解,使酶更容易作用底物。固定化细胞装在柱中使用,并供给 Mg^{2+} 离子,以维持操作稳定性 (Yamamoto 等, 1974)。

此外,还发展了一种生产苹果酸的类似方法,使用的是固定在聚丙烯酰胺中的产氨短杆菌。1974 年以来, Tanabe Seiyako 公司(田边制药株式会社)成功地运用此工艺,其产品用于治疗肝功能不良。固定化细胞在 37°C 下,生产半衰期为

525天,在1.0mol/L的延胡索酸转化成苹果酸达到平衡(80%)时,产品产率为70%。偶而会发现,加入胆酸盐除了使阻碍反应物进入细胞的细胞膜破裂外,还抑制了富马酸转成琥珀酸的副反应(Yamamoto 等,1976,1977)。

3.14.17 氨基酸

3.14.17.1 引言

氨基酸用作食品添加剂、医药制剂以及合成其他物质。酶法合成是最合适的,因为所得的氨基酸是生物活性最好的天然 L-氨基酸。化学合成产生 L-和 D-氨基酸的消旋混合物,这种混合物可用氨基酸酰化酶加以拆分。

3.14.17.2 酶法拆分

L-和 D-氨基酸的消旋混合物的拆分是通过乙酰化的氨基酸 DL 混合物来达到的,氨基酸酰化酶只水解这种混合物中的 L 型;产生游离的 L-氨基酸。日本的 Tanabe Seiyaku 公司进行工业化生产约有 10 年,该公司使用固定在 DEAE-Sephadex 上的米曲霉氨基酸酰化酶,并在柱反应器中使用(Chibata 等,1976)。此过程可说是工业化规模使用固定化酶的第一个例子,此拆分系统专门用于甲硫氨酸,但也记述过苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸消旋混合物的拆分(见本章第 3.11.2 节)。

此外,在使过程最优化上,也已作了不少努力,考察了一些因素,如固定化的难易和成本、固定化酶的稳定性、固定化酶活性再生的切实可行性,以及底物流速对反应速率和反应程度的影响等。据预测,使用 1000 升柱反应器,并获得 L-异构体的 100% 脱酰,因生成的氨基酸不同,预期产出 6.4—21.5 吨产物,而实际产量为此值的 70—90%。据估测,在

50℃ 下连续操作时,半衰期为 65 天,不过在使用 30 天后,要吸附上新鲜酶,其数量相当于 30 天运转期中失去的酶量,可在原柱上进行再生。改变柱的尺寸和底物流向,并不影响柱的性能。柱中产生的压降与底物的流速和柱长度成正比例。现已证实,DEAE-Sephadex 载体是很稳定的,使用 5 年后未见吸附容量和物理性质变劣。

上述操作的费用大约相当于使用可溶酶的相应操作费的 60%,这是因为减少了劳务费用,提高了产率,使产物易于分离。此外,还尝试过其他多种固定化技术,为达到这些目标,还试验了许多其他的酶。例如,可拆分消旋氨基酸混合物,因为有几类蛋白酶和肽酶专门水解氨基酸酯的 L-异构体,但遗憾是通常 D-氨基酸酯强抑制这些酶。D-氨基酸氧化酶也可用来专一地把 D-氨基酸转成 α -酮酸,还可用假单胞杆菌的 α -氨基酰基酰胺酶,这种酶作用 DL-氨基酸,生成 L- α -氨基酸和 D- α -氨基酰胺。

3.14.17.3 酶法生产氨基酸

天冬氨酸用于医药和作为食品酸化剂。1973 年以来,日本 Tanabe Seiyabu 公司已进行工业化生产,每立方米柱日产 1 700kg 产物。大肠杆菌细胞的天冬氨酸酶活性最初是固定在聚丙烯凝胶中,最近则固定在角叉菜胶中,用热处理制剂,以使催化副反应的夹杂物延胡索酸酶变性。在固定化中只损失较少的酶活性,固定化后,最适 pH 降到 8.5,失去对 Mn^{2+} 离子的敏感性,而且固定化细胞具有比固定化酶或游离细胞高得多的操作稳定性;37℃ 的半衰期约为 120 天。含有 1mmol/L $MgCl_2$ 的 1mol/L 的延胡索酸铵作底物,通常可得到 95% 的转化程度。此工艺过程取代了早些时候使用可溶天冬氨酸酶和发酵的工艺过程,可便宜 60%,细胞生产的

费用降到了原来的十分之一。如果不考虑所用催化剂的类型,在用结晶来回收产品这一点上却很相似 (Sato 等,1975; Chibata 等, 1976)。

D-苯甘氨酸也是用酶参与拆分 DL-苯甘氨酸酰胺的方法来生产的,D-苯甘氨酸偶联到 6-氨基青霉烷酸用来进行合成氨苄青霉素的半合成青霉素。得自恶臭假单胞菌的一种氨基肽酶专一地把 L-苯甘氨酸酰胺水解成 L-苯甘氨酸和氨,而 D 型没有变化。因为游离的氨基酸溶解度很低,会沉淀下来,留下光学纯度达 99.99% 的 D-苯甘氨酸酰胺。然后将 L-苯甘氨酸用化学法进行沉淀、水解、消旋后再循环使用 (Nielsen, 1980)。D-苯丙氨酸具有无瘾止痛的特性,大概是由于抑制了降解脑啡肽的酶。光学纯的 N-酰基-L-D-苯丙氨酸酯可从消旋的混合物制得,这是采用不受 L-异构体抑制的丝氨酸蛋白酶来拆分的 (Bauer, 1981)。

近来 Mitsui Toatsu 化学公司宣称,已建成用吡啶为原料的年产 200 吨必需氨基酸 L-色氨酸的工厂,并产出作为副产物的 DL-半胱氨酸和 DL-丝氨酸。生产方法尚未公开,也许是基于 Asai 等(1982)的美国专利,此项专利描述了 L-丝氨酸与吡啶在色氨酸合成酶或色氨酸酶催化下的反应, L-丝氨酸是用丝氨酸消旋酶作用 DL-丝氨酸或 D-丝氨酸而得到的。

Tanabe Seiyaka 公司也从 1982 年开始,把一种生产 L-丙氨酸的工艺投入运转。这是用固定化大肠杆菌细胞的天冬氨酸酶活性把延胡索酸转成 L-天冬氨酸,然后用德阿昆哈假单胞菌 (*Pseudomonas dacunhae*) 固定化细胞的 L-天冬氨酸 β -脱羧酶的活性,把天冬氨酸转化成 L-丙氨酸。现已证明,在同一反应器中使用分开固定化的细胞混合物是不利的,而且发现,最有效的是把两种固定化酶依次使用,这样必须把

两个柱间的反应物 pH 由 8.5 调到 6.0。固定化之前把细胞置于酸性 pH 下保温可去掉分别由延胡索酸酶和丙氨酸消旋酶形成的副产物 L-苹果酸和 D-丙氨酸 (Takamatsu 等, 1982) (见表 3.12)。此外, 由于底物在柱中流得慢, 又因为固定化 L-天冬氨酸脱羧酶产生的 CO_2 会引起 pH 变化, 因此要求柱在高压下运转, 以使 CO_2 保留在溶液中。该公司还有一种用 L-丙氨酸生产 L-瓜氨酸的工艺, 采用的是具有 L-精氨酸脱亚胺酶活性的固定化恶臭假单胞菌 (Chibata 等, 1975)。

第三种, 也许是最有意思的新型工业化生产氨基酸的工艺, 是由 Degussa AG (德意志联邦共和国) 最先开创的。它包括把 α -酮酸用底物专一的脱氢酶、NADH 和丙氨酸脱氢酶, 在超滤反应器中连续转化成相应的氨基酸。辅酶是通过连到水溶性的多氧乙烯聚合物上而保留在反应器中的, 并可在供给甲酸离子的条件下, 由甲酸脱氢酶连续再生。看来, 比较适宜的产物是 L-丙氨酸 (Wandbey 等, 1981)。此工艺是以第一个工业化规模使用酶超滤反应器而闻名的。虽说有人建议用酶超滤反应器, 但在此之前, 其进展从未超出过实验室

表 3.12 微生物经 pH 处理及未经 pH 处理的生产丙氨酸用的
固定化制剂的酶活性

微生物	pH 处理	酶活性 ($\mu\text{mol/h} \times \text{g}$ 使用的凝胶)			
		天冬氨酸酶	L-天冬氨酸 β -脱羧酶	丙氨酸 消旋酶	延胡索 酸酶
大肠杆菌	—	7 510	—	89.4	1 310
	+	7 470	—	1.0	1.4
德阿昆哈假单胞菌	—	—	1 140	28.0	745
	+	—	1 030	0.3	0.5

在用角叉藻凝胶包埋前, 在低 pH 下处理大肠杆菌和德阿昆哈假单胞菌细胞, 分别用 —pH 5.0, 45°C 处理 1 小时, +pH 4.75, 30°C 处理 1 小时 (Takamatsu 等, 1982)。

研究阶段。同样,在此以前,用在此过程的辅酶再生也从未用于工业化生产。

3.14.18 抗氧化剂

3.14.18.1 引言

由空气或溶解氧所引起的食物自发氧化往往会引起营养损失,风味变差,并生成毒素,例如,不饱和脂的氧化是一个普遍问题。酶可用作抗氧化剂,例如,有人提出用葡萄糖氧化酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、胆固醇氧化酶作为抗氧化剂,或用于去除食物中的氧或其他会起反应的物质。

3.14.18.2 葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4)

葡萄糖氧化酶是最常用的作抗氧化剂的酶,它用于防止食物在加工、运输、贮存中变色变味。例如,用在桔汁类饮料、啤酒和葡萄酒、调味汁、调味品以及种类繁多的脱水食物中(如蛋糕干粉及速溶汤料等)。黑曲霉和灰绿青霉、特异青霉是葡萄糖氧化酶的好来源,而且还产生过氧化氢酶。这种酶通过消耗氧化反应中产生的会使葡萄糖氧化酶变性的 H_2O_2 ,从而提高葡萄糖氧化酶的稳定性。

葡萄糖氧化酶也用于去掉鸡蛋和研压好的蛋清中的残留葡萄糖,以防止褐变反应及产生臭味。通常这种酶是与过氧化氢酶和 FAD 相结合的,因此在使用前必须从细胞中提取出来。这种酶价格较贵,因此用固定化酶系统也许是有好处的。用固定化葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶,在连续填充床反应器中所做的一系列实验中,会出现堵塞和生成凝胶。用沉淀和去掉粘蛋白的办法可去除这些复合物,但对蛋品加工工业来说,这样的溶液是不能令人满意的。

葡萄糖氧化酶也可用于葡萄糖的酶法测定,以及用葡萄糖生产葡萄糖酸。如果将高果糖浆或转化糖用葡萄糖氧化酶处理,可得到果糖和葡萄糖酸的混合物,然后再用离子交换层析分离开。葡萄糖酸作为食物和药物中金属离子的络合剂,也可用作糖尿病人的甜味剂。用葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶的混合物处理水产品,可延长它们的货架寿命。处理中生成的葡萄糖酸,会使 pH 下降一些,这样能抑制微生物的腐败作用,而不影响食物的风味。

3.14.19 蛋白质加工

3.14.19.1 引言

酶已被普遍用来增加蛋白质的价值及可利用性,例如,用酶法可从碎骨和碎鱼中回收蛋白质水解物。蛋白酶的底物专一性差别很大,把不同的蛋白酶合在一起。可用来提高蛋白质的水解程度,而且各种蛋白酶的最适 pH 等因素也不同,所以可在相当广范围的操作条件下使用。尽管已经知道许多种微生物蛋白酶,但植物和动物来源的蛋白酶却在工业应用中用得最广泛。这些蛋白酶包括植物来源的木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶、菠萝蛋白酶,以及动物来源的胰蛋白酶、胃蛋白酶和粗凝乳酶。与蛋白酶作用有关的问题是释放出疏水氨基酸而引起的苦味和难控制反应程度。需要指出的是,尽管有一系列来源专一性和特性不同的蛋白酶,但所能得到的肽酶却为数不多。蛋白酶的应用包括水解胶片上的明胶,从而回收银 (Korosi, 1976); 皮革处理 (Monsheimer 和 Pffeiderer, 1981) 以及用作洁净剂。在食品工业上,使蛋白质的内在功能特性通过有控制的蛋白质水解而达最佳,这些内在功能特性包括粘度、搅打起泡力以及乳化力。具体的实例有酶法修饰大豆蛋白和乳清蛋白,以使这些蛋白质更适合于食品应用;

酿制啤酒;水解小麦面筋;生产酵母浸膏;从胶原生产明胶;制备蛋白胨,这是用于微生物生长培养基中的蛋白水解物。而且也已证明,蛋白酶在回收屠宰场的血、下水、骨中的蛋白质,脱去血红蛋白的颜色,使这种丰富的蛋白资源容易为人们所接受,以及在回收鱼类加工工业的下脚料中的蛋白质方面都是有用的。显然,酶是吸附在底物表面上的(见 Ward 1983 的综述)。用蛋白酶从骨中提取明胶的报告已发表了数篇。因为鲜骨含有相当量的类脂,一些研究工作者发现,在提取明胶前,用少根根霉脂肪酶脱脂有利于明胶提取(Laboureur 和 Villabon, 1972)。

在食品加工过程中,蛋白质的许多特性,如溶解度、乳化活性、水脂结合力和弹性等会失去或逐渐减退。现在看来,这些损失是特别重要的,因为许多当代食品要求有高性能的蛋白质。例如,可用酶法磷酸化、糖基化或水解以提高蛋白质溶解度,而在酶水解的蛋白质回复溶解度后,并不引起其他有用特性的损失,这就需要仔细控制水解程度。同样,硫化二硫化物异构酶、巯基氧化酶或二硫化物还原酶可能在肉和面包中起有益的作用,特别是用了它们后可省掉添加到面包中的化学面粉氧化剂(Whitaker, 1977)。

最有前景的应用之一是使用等电可溶的大豆蛋白水解物强化热带国家的软饮料。由于这种水解物有良好的溶解度,也易于加到肉类制品中去。用蛋白酶从骨中提取明胶的报告已发表了数篇。半鲜牛骨含有相当量的类脂,一些研究者发现,在提取明胶前,用少根根霉脂肪酶脱脂有利于明胶提取(Laboureur 和 Villabon, 1972)。

其他两种非常有意思的蛋白酶的应用是:用蛋白酶把猪胰胰岛素转变成人胰胰岛素(Obermeier 和 Seipke, 1984);另一种是用氨肽酶有选择地水解消旋苯甘氨酸胺混合物的 L-苯

甘氨酸,生产医药上用的 D-苯甘氨酸。

血红蛋白脱色的工艺已得到开发。在酶水解后,不要的红色被吸附到活性炭上,并用离心和过滤去掉。现在正对这种几乎是无色的珠蛋白水解新产品的应用进行研究。

木瓜蛋白酶等类蛋白酶因广泛用于使肉变嫩而称著,其中以木瓜蛋白酶最为有用,它的热稳定性较好,所以在煮肉的早期仍在继续作用。最好的使用法是在宰杀前把酶注入牛的颈静脉。此法克服了与酶嫩化肉有关的主要困难,这样可使酶均匀分布,以至会出现均匀水解。胃蛋白酶、胰蛋白酶以及胰凝乳蛋白酶在临床上已用作消化剂,特别是包上肠溶衣的制剂使用得最广泛。此外,也用于制备预煮谷类食品和婴儿食品。在医药上蛋白酶还用于溶解血纤维蛋白,作为一种增强药物活性的消炎剂,以及用于治疗囊性纤维变性、烧伤、溃疡和痤疮[见 Christie (1980) 的综述]。最后要提到,木瓜蛋白酶已用作羊毛的防缩剂,羊毛表面受到某种程度的酶作用后,可起到免烫的精整作用。

3.14.19.2 类蛋白反应

此反应包括用蛋白酶水解蛋白质,接着改变反应条件,这样使蛋白酶起“逆作用”重新合成肽链,但是这些氨基酸和肽具有新的初级结构(顺序)。这个反应可用于把氨基酸酯联结进蛋白质,用甲硫氨酸强化大豆蛋白,把谷氨酸组合进去以提高溶解度,以及去掉不需要的残基等。例如,从供苯酮尿病人食用的蛋白质中去掉苯丙氨酸(Yamashita 等, 1975, 1976)。

3.14.19.3 天冬甜精 (aspartame)

天冬甜精是一种合成的双肽酯, L-天冬氨酸-L-苯丙氨酸甲酯,它的甜度大约是蔗糖的 200 倍。近来, G. D. Searle

公司已 在北美和欧洲出售这种产品。Mazur 等 (1969) 最初用化学法合成并作了报道。以后发展了改进的合成法, 其中包括使用嗜热菌蛋白酶(如金属蛋白酶)逆合成。使用金属蛋白酶的原因是因为与一般的蛋白酶不同, 它们无酯酶活性。产物的高产率及与此相关工艺的工业化生产可行性, 取决于天冬甜精分子在有过量的苯丙氨酸甲酯底物分子存在时, 形成的 1:1 加成化合物的倾向。在这种情况下, 可以有效地用一步同时进行纯化、分离和浓缩 (Isowa 等, 1979)。天冬甜精合成的酶法途径之一是用嗜热菌蛋白酶把 N-苄氧羰基-L-天冬酸与 L-苯丙氨酸甲酯缩合, 形成 N-苄氧羰基-L-天冬氨酰基-L-苯丙氨酸甲酯。Toyo Soda 公司已对此过程作了详细的描述 (Oyama 等, 1981), 与化学法不同, 这种酶途径并不产生检测得出的 β -肽联结的天冬甜精。 β -肽连接的天冬甜精有苦味, 因此必须从 α -异构体中分出去。

此外, 也可在某种醇存在下, 用枯草芽孢杆菌蛋白酶的酯酶活性, 烷基化苯丙氨酸来生产天冬甜精 (Davino, 1981)。

3.14.19.4 其他

近来, 已报道许多用蛋白酶生产医药和工业上重要的物质的其他例子 (见 Chaiken 等 1982 年的综述)。例如, 合成血管紧张肽-11 的衍生物 (Isowa 等, 1977), 以及合成亮氨酸脑啡肽及甲硫氨酸脑啡肽 (Kullman, 1980)。血管紧张肽是用木瓜蛋白酶、枯草芽孢杆菌蛋白酶或微生物金属蛋白酶以被保护缬氨酸-5-酰胺衍生物生产出来的。所用的反应物以叔-丁氧基羰基肽和肽乙酯分别作为羧基和胺的组分。木瓜蛋白酶在反应混合物中含有高浓度甲醇的情况下, 催化此反应, 而且不显出任何酯酶活性。

5 肽脑啡肽的每个键的生成不是由木瓜蛋白酶就是由 α -

胰凝乳酶催化的,是以叔-丁氧基羰基氨基酸和肽或它们的酯作为羧基组分,以肽酰肼作为胺的组分。

已报道用蛋白酶进行缩合反应,把大分子肽连在一起的肽半合成,而且已合成几种天然化合物,如胰岛素 (Mori-hara 等,1979)、葡萄球菌核酸酶-T (Komonya 等,1980)、蛋白酶抑制剂 (Sealock 和 Loskowski, 1969) 和核糖核酸酶-S (Homandberg 等,1982)。

Mori-hara 等(1982)以猪胰岛素作材料,用苏氨酸取代其 β -链末端的丙氨酸,生成人胰岛素。用羧肽酶 A 去掉丙氨酸,用胰蛋白酶催化连接上苏氨酸。反应中需要有大量很多的胺的成分,用有机溶剂也会提高产率。胰蛋白酶也可用来生成葡萄球菌核酸酶。使用分子截留 (molecular trap) 可促进核糖核酸酶和蛋白酶抑制剂的合成,在核糖核酸酶合成中,反应的产物是非共价结合到完整核糖核酸酶上的核糖核酸酶小片段,这样组成了一种新型分子,并通过质量作用效应促进酶的形成。

3.14.20 调味剂

在用大豆酿制酱油的过程中,把蛋白酶加入到发酵物中以缩短发酵时间。可把米曲霉和酱油曲霉的培养物固定化,作为最适 pH 为酸性、中性和碱性的内切及外切蛋白酶的复合混合物。此外,用碳水化合物酶进行处理,以降解包括鼠李糖和棉子糖等在内的不希望存在的糖。在豆浆制造中,也用中性蛋白酶脱除豆腥味。

曲霉和青霉的 5'-磷酸二酯酶用于把酵母核糖核酸降解为构成的核糖核苷酸。第二步则是用米曲霉的 5'-AMP 脱胺酶把单磷酸腺苷转变成单磷酸肌苷。这些鸟苷、腺苷、肌苷单核苷酸是很有用的调味剂,把它们以等摩尔量加入到谷氨酸

草钠中可提高鲜味。

可用粗凝乳酶处理的奶酪和乳酸制备出适于烘烤加工用的酸面团风味的调料,而且这种调料可以喷雾干燥。把奶酪分离出来,接入产生胞外酯酶、脂肪酶和蛋白酶的微生物,并保温培养。此外,也已发展出一种用固定化酶的连续水解工艺。

在提取植物油和树脂中已普遍采用细胞壁降解酶,因为这样可缩短提取时间,并增加产品产率。有意思的是,这些酶的功能之一是提高干植物组织得水速率。在这类制剂中,纤维素酶、半纤维素酶和蛋白酶是最普通的活性成分,此外,已在实验室规模用固定在琼脂凝胶中的恶臭假单胞菌降解咖啡因(Middlehoven 和 Bakker, 1982)。但是用超临界二氧化碳处理来生产脱咖啡因的咖啡,看来更容易为生产部门采纳。

3.14.21 水果加工

当代工业加工的果蔬种类繁多,有石细胞和无石细胞的温带水果和热带水果,其中包括苹果、梨、浆果、柑桔类水果以及蔬菜。在水果和葡萄浸解时,加入来自曲霉、根霉和木霉的果胶酶、半纤维素酶的混合制剂,以增加果汁、颜色和香味的提取。这是因为补充了水果中存在的内源酶的作用,并且也减少了发酵和澄清所需的时间。这些酶是通过降低水果结构部分的完整性,以及减少它们的持留水的容量而起作用的。在未成熟的水果中,果胶是以不溶态存在的,这有助于保持水果的硬度。但当水果成熟时,果胶为内源酶部分降解,从而使水果变软。果胶酶类包括果胶裂合酶、果胶酯裂合酶、果胶酯酶以及内切和外切多聚半乳糖醛酸酶(果胶酶)。果胶裂合酶只存在于真菌中,它们作用于高甲氧基果胶;果胶酯裂合酶主要存在于细菌中,主要作用于低甲氧基果胶或脱酯

果胶;果胶酯酶脱酯化聚半乳糖醛酸的甲基;内切和外切聚半乳糖醛酸酶(果胶酶)存在于真菌、植物和某些细菌中,它们水解聚半乳糖醛酸残基(Pilnik 和 Rombouts, 1981)。水果处理中最常用的酶是果胶酶(多聚半乳糖醛酸酶 EC3,2,1,15),这种酶与半纤维素酶、纤维素酶和(或)解淀粉酶一起,在水果捣碎时加入。果胶酶降解水果中的一种结构成分,即果胶的1,4 α -D-半乳糖醛酸键。果胶是一种杂多糖,是各种水果和蔬菜的结构成分之一,在加工过程中至少能部分溶解,因此会影响产品外观,有碍果汁的絮凝和(或)过滤,并降低果汁的产率。用果胶酶处理降低了果汁的粘度,这样就有可能生产出较稳定的浓缩产品。通常果胶酶制剂是一种得自曲霉的内切和外切聚甲基半乳糖醛酸酶的混合物(见 Fogarty, 1983 年综述)。

经加热的果胶冷却后会形成凝胶,因此可用于果胶和果浆制造。聚合物的羧基可自然酯化成甲氧基。一般说,当用含甲氧基量高的果胶时,胶凝化过程就需要使用高浓度的糖和酸,并要严格控制条件;而用低甲氧基果胶时,就不一定需要糖和酸,在有钙离子等类离子存在时,胶凝化过程容易进行。这种形式的果胶也可用作成膜剂,如用于酸乳酪和蛋黄浆加工。果胶酯酶(或更确切地称为果胶甲基酯酶)用于天然的高甲氧基含量果胶的脱酯。这些酶得自曲霉、青霉、镰孢(Ishii 等,1980)。通常是作为果胶酶制剂的杂质酶来使用的。

在水果加工中,加淀粉酶和纤维素酶降解存在于未成熟水果中的残留淀粉,因为淀粉的存在会使产品变雾浊。加了上述两种酶也有利于水果的浸解和颜色的提取。

近年来开发了一种专一于 β -1,3/ β -1,6 的葡聚糖酶,用于感染了灰色葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的葡萄制作葡萄酒的澄清和过滤。灰色葡萄孢产生对右旋糖苷酶不敏感的

β -1,3 连接的葡聚糖, β -葡聚糖酶在水解啤酒中 β -1,4 连接的大麦来源的葡聚糖上是有用的。分解 β -1,3 连接的葡聚糖也有利于防止葡萄酒中污染的微生物悬浮物, 这样可大大节省防止微生物感染所需要的二氧化硫量 (Dubourdieu 等, 1981)。同样, 淀粉葡萄糖苷酶还用于去掉用未成熟苹果生产的果汁中的淀粉浊雾。

有人提议用固定化蛋白酶来防止蛋白质从溶液中析出所造成的葡萄酒浊雾, 但是由于受到酚、铁离子、乙醇的抑制, 这样的制剂的稳定性较差。也有用固定化细胞在发酵后进行葡萄酒脱酸处理的。这很重要, 因为丙二酸乳酸发酵把苹果酸转化成乳酸, 酸度随着降低, 这样的变化是不希望在酒瓶中发生的, 但在装瓶之前进行这种次发酵却是很有利的, 可增加葡萄酒的酒香味。例如, Gestrekins 和 Kjaer (1983) 把酒明串珠菌的细胞固定在海藻酸凝胶中进行葡萄酒脱酸。以采用把活细胞固定在海藻酸凝胶中, 并贮存在含有 5—12% 乙醇的无菌葡萄汁的休止培养基中为宜。

酒石酸是制造葡萄酒的重要副产物。在传统的葡萄酒酿制中, 从葡萄酒的沉积物酒石中可得到右旋的酒石酸。但这是一种不稳定而且有限的来源, 理想的方法是把易得到的物质顺丁烯二酸酐或顺丁烯二酸, 用化学法转化成顺-环氧琥珀酸, 然后用酒石酸诺卡氏菌 (*Nocardia tartaricans*) 的顺-环氧琥珀酸水解酶生物转化成酒石酸。生长细胞、干细胞或磨碎的细胞, 甚至纯化的细胞提取物均可使用 (Miura 等, 1977)。

酶在水果加工中的另一种重要用途是用柚苷酶和柠檬苦素酶水解某些柑桔类水果的苦味, 特别是葡萄柚的苦味成分。水解后生成鼠李糖和普鲁宁 (Prunin) (柚配质-7-葡萄糖苷), 水果的天然黄色并未受到损失。通常柚苷酶是以不纯的制剂形式被使用的, 而且柚苷酶是果胶酶中常见的杂质成分

(Chandler 和 Nichol, 1975)。采用固定在丙烯酰胺凝胶中的球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*) 细胞,已在实验室中成功地进行桔汁的脱苦味,桔汁的其他性能仍保持原样,在多次使用后仍保留细胞的活性。已检别出的主要代谢物是17-脱氢柠檬苦素-A 环内酯,参与反应的是柠檬苦素 D-环水解酶和柠檬苦素脱氢酶(Hasegawa 等, 1982)。球形节杆菌细胞也能脱去一种三萜,诺米林(nomilin)的苦味,这种物质与某些柑桔类水果的后味发苦有关(Hasegawa 和 Pelton, 1983)。

3.15 酶在提取天然产物中的应用

已有许多报告提到应用酶从鱼、油菜籽、酵母、棕榈果和大豆等来源提取油。在棕榈油的提取中使用纤维素酶和果胶酶。已发现大豆和鱼中的不少油是与蛋白质结合的,因此加入蛋白酶增加了油和蛋白质的产率。以使用耐热的蛋白酶为宜,但酶的使用通常受到各种过程物流的最低含水量的限制。现已用绿色木霉和黑曲霉的纤维素酶、半纤维素酶和蛋白酶来提取大戟的烃(Weil 等, 1982),同样的酶也用于提取嚏根草的皂苷配基(Isacc, 1977)。

目前已发展出一种用黑曲霉的碳水化合物酶和纤维素酶混合物来松开虾壳和提取蛤内脏块的加工过程(Fehmerling, 1970)。已用葡甘露聚糖酶来处理咖啡提取物,以在浓缩前降低它的可溶性胶的分子量,肽谷蛋白水解酶用于增加含肽原料水解制作的食品和饮料中的谷氨酸或谷酰基肽的含量。这种酶是由环状芽孢杆菌产生的,而且在菌体自溶时释放出来(Kikuchi 等, 1974)。

有时利用内源微生物酶来破碎产生这些酶的母细胞,以

提取有用的胞内材料。例如,在酵母浸膏生产过程中,细胞在 pH5 左右, 55℃ 下自溶。蛋白酶可能是最重要的一类与自溶相关的酶,当然葡聚糖酶、脂肪酶、核酸酶等也有一些活性。已有人尝试用添加木瓜蛋白酶等外源蛋白酶的办法提高提取速率和最终得率。

溶菌酶的混合物得自放线菌、无色杆菌和假单胞菌。在培养产溶菌酶的母细胞时,以细胞容易自溶种类的菌细胞作为诱导物(Shinkarenke 等,1976)。特别有意思的是尝试用链霉菌制剂溶解致龋齿的微生物,如变异链球菌(*Streptococcus mutans*) (Yoshimura 等,1975)。这些酶可在掺入羧甲基纤维素、甘油或单乙醇胺后加以稳定。

3.16 解 毒 酶

内源酶作用于食物,常会生成毒素或抗营养化合物,特别是在食品加工过程中,当食品的结构完整性降低时,例如在细胞材料破裂之后,更容易生成毒素和抗营养化合物。另一方面,有毒的内源物质可用酶降解成无毒的物质。因此控制这样的过程是极有价值的,例如采用热变性去掉有害的酶。最重要的物质有三类,第一类是毒物糖苷,如致甲状腺肿的硫氰酸盐、异硫氰酸盐和噻唑烷硫酮。第二类是寡糖,如会造成异常碳水化合物代谢的水苏糖、棉子糖、乳糖等。第三类是磷酸酯,例如核酸和植酸分别会引起尿酸沉积并出现类痛风状症状,以及与必需的食物金属和蛋白质复合。核酸可用内源的酵母核糖核酸酶水解,这种核糖核酸酶可采用热冲击细胞来活化(Maul 等,1970),植酸可用内源的植酸酶部分降解,但也需要以小麦芽的形式添加额外的植酸酶(Kon 和 Ohlson, 1973)。

污染物可能是天然的化合物,如木质化木材,也可以是人工造的,如有机磷杀虫剂。使用微生物酶是降解污染物的有效手段,因为许多种微生物在它们天然的环境中,千百代进行着降解作用,以保护母体细胞免受毒害,或把污染物作碳源或能源。解毒可导致污染物完全无机化或者部分分解,失去有害的生物学活性。虽说人们已生产出许多种潜在的毒素,但其中只有少数难于降解,这些毒素具有抗生物作用,并会在环境中存在相当长的时期。

使用仍与整个细胞相连的酶,而不是用分离出来的酶去降解废弃物,会显得十分有利,因为酶存留在基本上完整无缺的细胞壁和细胞膜中,至少部分免受变性剂的作用而得到保护。此外,与降解有关的一些酶通常是难于以全部活性的形式被提取出来的。

近来已进行了相当多的有关酶法和微生物法降解杀虫剂的研究。例如,已发现恶臭假单胞菌具有脱卤素酶,这种酶会降解从杀虫剂或除草剂衍生出来的一氯乙酸盐、二氯乙酸盐和氯丙酸盐。特别是在恒化器中观察到茅草枯(Dalapon)降解活性可稳定2万小时以上(Slater等,1979; Berry等,1979)。还从适应生长于对硫磷的混合微生物种群中提取到一种酶,它能水解许多种有机磷杀虫剂。这种酶也可成功地制成固定化酶,使用方便,其操作半衰期为280天(Mannecke, 1976, 1977)。

α -淀粉酶已用于澄清胶质淀粉-白土悬浮液,这种称为“白水”的悬液是造纸厂大量产生的。酶处理后,加入明矾可很容易地使固形物絮凝。把酶固定化是有好处的,这样酶可重复使用,而且在循环澄清水并将澄清水用于造纸之前,不需要进行破坏酶的处理(Smiley, 1974)。其他应用包括:用过氧化氢和过氧化物酶法交联污染物,从煤炭、树脂、塑料和纺

织工业的废水中去掉联苯胺、萘胺、氨基酚等致癌的芳香胺 (Klibanov 和 Morris, 1981)。还可利用固定化匍柄霉 (*Stemphylium loti*) 解除氰化物的毒性 (Nazaly 和 Knowles, 1981)。

棕色的部分氯化的木质素衍生物, 通常称为“牛皮纸木质素”, 它存在于纸浆厂的流出物中。这种物质可包埋在海藻酸钙珠中, 并以蔗糖作为碳源和能源的白腐真菌、采绒革盖菌 (*Coriolus versicolour*) (Livenocke 等, 1981) 或分解木质素的真菌、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete Chrysosporium*) (Kirk 和 Yang, 1979) 进行脱色。这种生物法是化学漂白木质素法的代用法, 这一点特别重要, 因为已有人提出, 漂白时产生的氯化木质素是致突变的。

固定在海藻酸盐中的脱硝酸盐假单胞菌 (*Pseudomonas denitrificans*), 已用于去除饮水的硝酸盐。给菌细胞供以外源碳源, 菌细胞会把亚硝酸盐和硝酸盐完全氧化成气态产物。当在连续反应器中运转时, 细胞活性会衰变, 半衰期为 30 天。如在全营养液中间歇保温后, 会生长出新的细胞, 并提高反应速率 (Mattiasson 等, 1981; Nilsson 和 Ohlson, 1982)。

使用吸附到石棉上的真菌出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullatans*) (Takahashi 等, 1981) 和用吸附到无烟煤上的假单胞菌细胞或包埋在海藻酸盐凝胶的细胞 (Hackel 等, 1975), 已降解掉医院和化验室废水中以及煤炼成焦炭过程中产生的废水中的残留酚, 还可去掉 H_2S 和 NH_3 。这种处理的优点是避免了使用生物污水处理系统。酶甚至可用于脱除神经毒气的毒性。美国陆军已使用从枪鸟鲷神经纤维中取得的一种酶, 把它固定在琼脂糖凝胶珠中, 以使神经毒气 Soman (1, 2, 2-三甲基丙甲基偶磷酰氯) 及它的衍生物变得无害。

3.17 加酶去垢剂

大量的酶用于去垢剂。典型的去垢剂蛋白酶是由枯草芽孢杆菌和地衣形芽孢杆菌所分泌的丝氨酸蛋白酶，它们耐碱(pH9—13)、耐热、抗去垢剂。因为去垢剂含有使水软化的多价螯合剂，故不能使用金属蛋白酶。从嗜碱的芽孢杆菌得到的蛋白酶对碱性条件具有特别的耐受能力，而且可在有表面活性物质存在的条件下生长。这类菌也常会产生中性蛋白酶，而中性蛋白酶使碱性蛋白酶活性受到显著损失。通常用盐析法把酶从溶液中析出并过滤回收。这些碱性蛋白酶甚至在预浸的较低温度下和微碱性 pH 条件下也作用得很好。成功地使用加酶去垢剂可追溯到 60 年代中期，Novo 公司首次推出耐碱的蛋白酶，商品名称为 Alcalase。

把蛋白酶和 α -淀粉酶用于去垢剂中，水解含有蛋白质和淀粉的食物残屑也是有可能的。但是在实际使用中， α -淀粉酶却受到氯存在时不稳定的限制，作漂白剂用的氯存在于大多数洗碟机洗剂的配方中。

加酶去垢剂的发展趋势是用于预洗浸泡或污渍处理，以及在较低温度下洗涤以节能。看来也会逐渐流行使用液体去垢剂。本世纪 70 年代，由于一些生产工人和消费者出现过敏反应，曾导致加酶去垢剂市场崩溃。现在这些问题已用制成无粉尘制剂的办法基本得到解决，即把酶加工成颗粒状，通常还包裹上蜡、纤维素、聚二醇、右旋糖苷等惰性层。在其最复杂的称为“造粒”加工过程中，把酶与填充剂、结合剂及水相混，制成球形后在蜡中包膜，并喷雾冷却，形成直径 0.5—1.0mm 的小粒。

3.18 用酶作清洗剂

酶也用在清洁管道、热交换器、贮罐内外的固形物或膜状覆盖物的清洗剂中。此类制剂是含有枯草芽孢杆菌孢子、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶等的混合物,甚至在下水道等一些不溶性固形物含量高的系统中这类制剂也能作用。

工业过滤器出现堵塞是特别费钱而且麻烦的事,虽说可用反冲洗和用澄清溶液循环等措施来预防,但仍免不了出现堵塞。这样的例子是很多的,其中包括过滤干酪乳清回收蛋白质及过滤果汁和葡萄酒中出现堵塞。清洗液通常是由酶和去垢剂组成。正确的配方决定于具体应用,例如,胰蛋白酶和木瓜蛋白酶用于堵塞的乳品滤品; α -淀粉酶和 β -葡聚糖酶用于酵母和谷物过滤品;纤维素酶和果胶酶用于葡萄酒和果汁等的过滤器。Genex 公司特别重视住户和房屋管理员使用的产品,例如,去除浴室霉污的制剂,因为现有的产品不是有危险就是效果不佳,也因为这类新产品在出售前不需要经过像药品和食品那样全面广泛的测试。

3.19 制革工业

浸泡制革原料皮的目的,最初是为了清洗它们,并使它们重新吸水。加入低浓度的蛋白酶可加快吸水。使用胰蛋白酶的效果特别好,因为酶中沾染的脂肪酶会使脂肪和胶质溶解,进一步加快了水的吸入。

脱毛加工过程是在很碱的浴槽中用枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶来进行的。碱性条件促使毛根膨胀,这样蛋白酶能有选择地作用于毛囊中的蛋白质,而使脱毛容易。另一些专用蛋

白酶用于特殊种类的皮。

羊皮的脱毛通常是采用把含有石灰、氯化钠及蛋白酶的涂层敷到皮的内面,然后保温。对于较薄的带毛的羊皮,只需用活性差些的酶,而且可以粉末状态敷上。也有报道,用木瓜蛋白酶作有限的表层蛋白水解,防止羊毛缩水。

皮革熟皮过程涉及降解某些弹性蛋白和角蛋白,去掉残留的毛以及胶原退胀。工业上可使用的蛋白酶种类不少,这取决于皮的类型和质量,此工艺过程仍是技术要求很高的手工艺,如果要生产出优质革,就需要凭经验来控制 pH、温度、酶浓度、处理时间等条件。

3.20 纺 织

通常用粘性淀粉来给织物上浆,以增加纺织过程中织物的强度。随后用细菌 α -淀粉酶液化淀粉来退浆,这是因为上了浆的织物吸收液体的能力差,会使染色和漂白等操作发生困难 (Underkofler, 1976)。最有用的退浆剂是细菌 α -淀粉酶,因为在较高温度条件下操作会加速脱浆,也因为细菌 α -淀粉酶对抑制剂和温度的抗力强。淀粉和糊精似乎起了稳定酶的作用。反应可在 50—75℃, pH5.5—7.0, 并有确保细菌和真菌酶均匀作用的表面活性剂存在的条件下进行。用地衣形芽孢杆菌 α -淀粉酶退浆时,温度可高到 105—110℃, 反应时间可缩短到 1—2 分钟。

3.21 造 纸

淀粉用来给纸表面上浆,也可用作表层粘合剂,但在取得强度和坚硬度等优良性能之前,必须先降低粘度。可用酸水

解法进行水解或用次氯酸钠氧化。另一种方法是使用 α -淀粉酶,包括将淀粉与酶一起加热,这样淀粉颗粒膨化,然后胶凝化 (Kalp, 1975)。紧接着用酶稀化淀粉,最后用蒸气迅速加热,使酶变性并使淀粉全溶解,在使用前淀粉需要再稀释。如用马铃薯淀粉,则用真菌 α -淀粉酶在 50℃ 下反应,但用玉米淀粉时则用细菌 α -淀粉酶。因为真菌 α -淀粉酶只能在较低的温度下起作用,而这样的温度是低于玉米淀粉的凝胶化点的。最近的进展可参阅 Clayton 等(1984)的综述。

3.22 抗 生 素

工业化生产的抗生素约有 150 种,它们在医药和农业中有许多用途。实际上它们都是用传统的发酵法生产的,有些抗生素在发酵以后还要进行酶法修饰 (Bredelius, 1978)。在抗生素自然分泌到培养基中的情况下,固定化完整细胞提供了更有效的生产现有抗生素的可能性,尤其是应用于新抗生素的生成。Morikawa 等 (1979) 报道,使用固定在聚丙烯酰胺中的产黄青霉以葡萄糖生产青霉素 G。这个研究小组还用芽孢杆菌细胞以同样的方式生产杆菌肽 (Morikawa 等, 1980)。在反应器中使用时,这些细胞的活性半衰期为一周,但产率受到细胞生长的限制。

3.23 青霉素酰化酶

在青霉素分子 6-氨基上取代的酰基侧链的化学性质对青霉素分子的抗菌活性和毒性有显著影响。实际上,各种半合成青霉素都是用化学取代方法从 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 合成的。苄青霉素和苯氧甲基青霉素(分别为青霉素

G和V)是用发酵法生产的,然后用固定化青霉素酰化酶处理除去侧链,但并不使分子内敏感的 β -内酰胺部分发生降解。苄青霉素形成 6-APA 和苯乙酸。

这是把固定化酶用于制药工业的最著名的工艺过程。包括 Beechams、Bayer、Snam Progetti、Tanabe Seiyaki、Squibb、Artra 等公司在内的一些公司都发展出本公司的工业化生产规模的工艺过程 (Lagerlof 等,1976)。

通常是从大肠杆菌取得酶,并在 pH4.5—5.5 下使用。这种酶的分子量为 70 000,为苯甲烷磺酰氟所抑制,但不为二异丙基氟磷酸所抑制,表明丝氨酸不在活性中心。十二烷基硫酸钠可以把酶可逆地解聚成分子量为 20 500 的单位,通常是采用分离出来的酶。Tanabe 公司的工艺用的是包埋的完整细胞。有的公司已采用其他微生物作为青霉素酰化酶酶源,例如 Squibb 公司用巨大芽孢杆菌, Biochemia 用铅灰色球菌 (*Bovista plumbea*), Toyo Jazo 公司用无色杆菌。

当酶被固定到带电荷的载体上时,酶的最适 pH 会改变。例如,固定到带正电荷的载体上的酶,表观最适 pH 向较低的 pH 值方向移动,这是因为从载体内部向外排斥氢离子,因此局部 pH 比载体外的要高。合成的最适 pH 比溶液中酶催化活性的最适 pH 高 3.6 个单位,在青霉素合成中是有好处的。在青霉素工业和其他一些制药工业中,最好用固定化酶,因为把酶用共价键很好地接到载体上,就不会污染产物。此外,在固定化酶的填充床柱反应器中,用去掉产物的办法有助于反应进行到底。

在 Astra 所用的工艺中,纯化的大肠杆菌青霉素酰化酶是固定到溴化氰活化的 Sephadex G-200 (Lagerlof 等,1976)上的。其他公司用的载体有三醋酸纤维素纤维,膨润土加上助滤剂和 DEAE-纤维素。在交联以后有 48% 的酶活

性回收到聚合物上,其活性大约为每克湿聚合物 225 单位。这种酶制剂从 1973 年开始用于批式工艺工业化生产 6APA。每批水解 100kg 青霉素 G, 用 16.5kg 湿 Sephadex-酶复合物(相当于 3.7×10^6 单位), 反应温度为 35℃, pH7.8。只要操作仔细, 这种固定化酶可使用上百批而不需要添加新鲜的酶。在酶的回收和再放入时必须特别小心, 以免失活。反应器的设计还具有一些优点, 如较高的生产容量和较低的成本。与使用完整微生物细胞悬液的老法相比, 这一新工艺具有产率较高、产品较纯、催化剂易操作使用以及较为经济等优点。在 37℃, pH7.8 条件下的再循环过程中, 所得的 6APA 的纯度为 98%, 产率为 90%。

由此可推断, 没有出现蛋白质从载体脱漏现象, 因此可生产出过敏性低的 6-APA 和半合成青霉素。一般说, 必须用专门的纯化步骤从 6-APA 中去除会引起过敏的蛋白质。

用适当组合的酰基氯或用酰化酶逆合成 (pH 值稍高于 7.0), 可在 6-APA 母核上加上新的侧链。由于难于使酶反应进行到底, 后一方法在某些情况下是不易进行的 (例如, 在氨苄青霉素生产中)。Toyo Jozo 有限公司 (日本) 发展了一种吸附在 DEAE-纤维素的巨大芽孢杆菌或无色杆菌细胞生产氨苄青霉素的工艺 (Fuji 等, 1973)。它是把 6-APA (0.3%) 和 D-苯甘氨酸甲酯 (0.09%) 的溶液通过含有固定化无色杆菌细胞的柱进行合成的, 柱的流速为每小时半个柱体积, 氨苄青霉素的产率为 54%。Otsuka 制药有限公司已使用吸附在 DEAE-Sephadex 上的琥珀酰化的青霉素酰化酶来合成氨苄青霉素。为了减少酶的渗漏, 把酶琥珀酰基化, 引入一些羧基, 这样增强了酶和固体载体间的结合力。酶载体复合物装在柱中, 37℃ 下使用, 氨苄青霉素的产率为 67%, 但使用 10 次后产率降到 58% (Kamogashira 等, 1972)。

其他生物催化剂潜在的用途包括用顶头孢 (*Cephalosporium acremonium*) 的无细胞提取液, 将异青霉素 N 外消旋化为青霉素 N (Demain, 1981)。

3.24 头 孢 霉 素

头孢霉素类抗菌素可用发酵法直接生成, 或用酶法脱酰基形成 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 母核, 然后通过酰化, 引入所需的侧链而生成。另一种方法是用化学法把青霉素的五元环扩充成六元的头孢霉素二氢噻嗪环, 用酶法去侧链时反应基团不需要保护剂。

具有代表性的是 Toyo Jozo 公司已使用巨大芽孢杆菌的脱酰酶, 用苯乙酰基 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸生产 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸 (7-ADCA) (Fuji 等, 1976)。所使用的酶是吸附在硅藻土上, 并装填到填充床柱形反应器中, 产率为 85%。以同样方法使用雷氏变形菌 (*Proteus rattgeri*) 所产的同一种酶, 可得到 90% 的产率。Abbot 和 Berry (1982) 用链霉菌 (*Streptomyces capillispira*) 所产的酶使头孢霉素甲基酯去酯化。

在所有反应中, 通常积累的是热力学上有利的产物, 因为从微观看, 一切反应都是可逆的, 选择合适的条件可进行逆反应。因此, 固定化的巨大芽孢杆菌的酶也能用来进行逆反应, 即把 7-ADCA 或 7ACA 酰化。其他公司也发展了基本上相同的工艺, 通常是使用不同微生物来源的酶和其他固定化载体。

酶反应还与许多种药物的作用方式有关, 例如, 药物起酶抑制剂的作用。因此产棒酸链霉菌 (*Streptomyces clavuligerus*) 产生的棒酸 (clavulinic acid) 抑制使青霉素失去活

性的 β -内酰胺酶。把青霉素和 β -内酰胺酶抑制剂一起使用,成为更有效的结合,例如 Beechams 出售一种棒酸钾和羟氨苄青霉素 (amoxycillin) 的混合物,商品名为“Augmentin”。另一种抗生素增效剂 7-羟基草酚酮也遵循同样的原理,这种物质抑制通过把腺苷残基加到抗生素分子上而使氨基糖苷抗生素(如链霉素)失活的一些细菌酶。此外, Bayer 出售一种商品名为“Acarbose”的小肠 α -葡萄糖苷酶抑制剂,它可通过延缓糖吸收来治疗糖尿病。

已有人用固定化酶磷酸化卡那霉素之类的氨基糖苷抗生素(英国专利 1485797,1977)。

最后,已有人用 β -转氨甲酰酶把氨甲酰基转到 3-羟甲基头孢霉素上,生产半合成头孢霉素抗生素,3 氨甲酰氧甲基头孢霉素。这种酶是从链霉菌细胞中提取的,在使用前用达诺磨破碎细胞并纯化。Deo 和 Gaucher (1983) 采用首先使固定化细胞生长,然后在无氮培养基中批式使用的办法使固定化在 κ -角叉菜胶中的荨麻青霉 (*Penicillium urticae*) 稳定产生抗生素棒曲霉素。它的半衰期比游离细胞或先游离生长然后固定的细胞使用半衰期要长 3 倍多。用固定化酶制备药物的其他情况可参阅 Abbot (1976) 的综述。

3.25 生物催化剂的其他用途

还有许多种生物催化剂的应用难于归在上述标题下,包括用酶法从羧酸合成用于调味品的酯和内酯 (Garfield 和 Sand, 1984); 用胰蛋白酶从埃及木乃伊上抽取出莎草纸手稿; 用枪鸟鲷的二异丙基氟磷酸酶解除报废神经毒气库存品的毒性; 把血红素包埋进聚氨基甲酸乙酯中作人工鳃,直接从海水中提取氧气。把固定在琼脂糖上的肝素用于体外支路,

防止用心肺机治疗期间血凝块的生成。用甲基杆菌 (*Methylobacterium organophilum*) 的甲醇脱氢酶把甘油氧化成戊二醛,用于化妆品制造 (Wolf, 1982)。用链格孢 (*Alternaria tenuis*) 和采绒革盖菌 (*Coriolus versicolor*) 的漆酶 (一种多酚氧化酶) 加快传统的日本漆 (Urushi) 的干燥;把 β -葡聚糖酶、纤维素酶和戊聚糖酶的混合制剂掺到家禽的大麦片饲料中,提高这种饲料的可消化性等。

至少在一种牙膏中含有葡糖氧化酶和淀粉葡糖酶,这两种酶联合作用于淀粉所产生的过氧化氢具有杀菌作用。固定化单宁酶用于使“茶膏”(“tea cream”)溶解 (Weetall 和 Detar, 1974; Coggan 等, 1975)。茶膏是酚和咖啡因的复合物,它们在茶冷凉静置时会沉淀下来,这会给制造速溶茶产品带来困难。

在胶片中酶膜的应用是很有趣的,它是根据稳定的无酶活性的胰凝乳蛋白酶衍生出的顺式 α -胰凝乳酶衍生物 (cis-4-nitroconnamoyl- α -Chymotrypsin), 在受到紫外线照射后起顺反异构化,最后生成不稳定的相应的反式- α -胰凝乳酶衍生物。这种反式衍生物会很快水解,产生有活性的酶,在有酶底物存在的情况下,会使系统发生显著的化学变化,结果增强了光效应。

3.26 结 论

目前,酶已对工业造成冲击,即使是中度的,但已引起人们的注意。据估计,1981年工业酶的世界市场约为65000吨,产值约4亿美元。估计相当于世界催化剂市场的10%。对未来市场的预测看法不一,总的讲是乐观的,原因之一是酶价上涨比物价上涨要慢。从近期看,有工业化生产可能的是

用固定化乳糖酶把乳清水解成单糖糖浆,这种糖浆在营养上较易为不能耐受乳糖的人和动物所吸收,而且比原来的乳清容易运输和贮存。从中期看,把半乳糖转化成更有用的单糖葡萄糖,它的转化优越性可与具有较低最适 pH 以减少颜色生成的葡萄糖异构酶相提并论,也与抗钙离子抑制和(或)生产出含有比现在达到的果糖含量高得多的糖浆相当。从长远看,达到用酶把纤维素水解成葡萄糖浆的方法,对于食品工业以及发酵法生产燃料乙醇来讲,都是了不起的重大突破。主要的进展极有可能是从新酶发现上出现的,而不是通过改进反应器的设计。通过把蛋白质工程和基因工程结合起来,使酶的特性专一化的能力,从长远看将会得到应用,至少在微电子方面,开发新的小型集成电路装置是有可能做到的。

要使这些潜在的工艺获得成功,需要多种训练的专门技能,而且需要有使科学技术以及工业化生产都获得成功的正确的经济和政治环境。酶应用的前景是光明的,如果我们所面临的许多经济和环境问题得到解决的话,前途还会更光明。无疑,我们还会不断地为酶技术领域取得的新进展所展现出来的丰富多采的想象力、娴熟高超的技巧和不同凡响的独创精神惊叹不已。

证 据 说 明

生物催化剂应用于工业和其他方面的速度的一个很好指标,是在本章编写期间新涌现的生物催化剂的数量和多样性。在化学工业中的应用特别明显。在这一工业部门中使用生物催化剂的步伐是缓慢的,这大概是因为与制药等工业相比,许多产品的产值比较小,也因为对大多数反应物的生物学性质了解得不透澈,以及需要在非水溶剂中进行反应。虽说如此,

还是取得一些进展,这可用下列例子加以说明。

丙烯酰胺

Nitto 化学工业公司已推出一种从丙烯腈生产丙烯酰胺的酶法工艺,并计划在 1985 年建成年产 4 千吨的工厂。到目前为止,丙烯酰胺的生产需要使用昂贵的无机催化剂。酶反应中使用一种固定在丙烯酰胺中的腈水合酶。这种工艺有不少优点,可得 100% 的产率,而反应是在 10°C 下进行(化学工艺需要 80—140°C),可节省能量,而且产物很纯,在聚合前不需要进一步纯化。此种酶是棒杆菌或诺卡氏菌产生的。添加聚合抑制剂防止产物过早聚合会影响到酶。但用乙二醛或戊二醛处理可逆转这种影响 (Watanabe 等, 1981)。

氧化丙烯

丙烯生成氧化丙烯是化学工业中一种重要的转化, De Bont 等(1981)指出,此反应可由分枝杆菌的乙烯单加氧酶来完成。埃克森 (Exxon) 公司的 Hou 等用嗜甲烷细菌(如 *Methylosinus*) 的甲烷单加氧酶固定化在玻璃珠上环氧化气态丙烯。此反应需要 NADH_2 再生并润湿丙烯。供给甲醇可使细胞成功地再生。这是在生物技术中气相反应的罕见实例。

此外,埃克森公司还采用生长在丙烷上的新分离的细菌休止细胞上的丙烯单加氧酶。与丙烷和丙烯的反应看来是由单种酶介入的。可从无细胞溶液的级分得到这种酶 (Hou 等, 1983a,b)。

氯乙烯

生物催化剂也有使化学工业废弃物脱毒的潜力。例如,从聚氯乙烯生产工厂附近的环境中分离到能降解致癌的氯乙

烯的分枝杆菌,而且以固定化形式得到应用,可降解供给的氯乙烯量的 99%。这方法有相当大的潜力,因为现在用燃烧去掉氯乙烯的办法是很费钱的 (De Bont 等, 1981)。

其他引人注意的最近进展是在下面一些领域。

生物传感器

此技术的最近进展包括这种装置的应用面扩大,特别是在装置的微型化方面所取得的进展。例如,已制出由 Si_3N_4 -栅 pH 敏场效应晶体管 (FET) 组成的半导体,在其上沉积一层青霉素酶-白蛋白膜而对青霉素敏感 (Matsuoka 等, 1984)。另一种新的发展是使用固定化在氧电极上的鼠伤寒沙门氏菌的回复突变型以测定试样的潜在致癌力,这样可进行快速自动 AMES 诱变性测试 (Karube 等, 1979)。此方面的综述可见 (Gronow, 1984) 的文章。生物催化剂和微电子相结合的最终潜力可由发展带生物元件的计算机所进行着的说明性研究显示出来。

氨基酸

在生物催化剂方面另一个快速进展的领域是氨基酸生产,部分是由需要大量的天冬氨酸和苯丙氨酸以制造天冬甜精所促进的。特别是促进了苯丙氨酸的生产,直到最近苯丙氨酸只能少量生产,而且价高。Tanabe Seiyaku 公司发展了一种把乙酰胺基肉桂酸转化成 L-苯丙氨酸的工艺,产率为 94%,使用的是从土壤和污泥中分离筛选到的粪产碱杆菌和球形芽孢杆菌的完整细胞 (Nakanishi 等, 1981, 1982)。Genex 公司用苯丙氨酸氨裂合酶,从反式肉桂酸盐和铵离子生产 L-苯丙氨酸 (Swann, 1984)。Genex 公司还有从甘氨酸和甲醛生产 L-丝氨酸的工艺,所用的丝氨酸羟甲基转移酶已克隆进大肠杆菌和其他宿主细胞 (Anderson 等, 1984)。

第4章 酶固定化和生物亲和 方法的技术资料

J. F 肯尼迪

4.1 引言

本章集中讨论有关的化学反应，因为酶活性的主要损失通常是由于在酶的活性中心或酶的结合部位发生反应所引起的。此外，固定化过程中酶构象发生变化也会造成活性损失，这与以下两方面有关：

- (a) 酶的附着点；
- (b) 支持物表面新的微环境。

4.2 包埋

4.2.1 凝胶包埋

在A部分已经讨论了聚合物凝胶包埋酶，主要凝胶是聚丙烯酰胺，它是丙烯酰胺与交联剂 N,N-亚甲双丙烯酰胺聚合生成的。这个过程需要过硫酸钾 ($K_2S_2O_8$) 或者核黄素作为引发剂，并由 4-二甲氨基丙腈 (DMAPN) 或者 N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED) 催化，结果生成如图 4.1 所示的三维空间结构。为了防止酶分子热变性，反应要在低于 25°C 和无氧条件下进行，但正如前面指出的，反应过程中产

生的自由基会造成酶的降解。

自然界中存在的聚合物如明胶、 κ -角叉菜胶、藻酸盐、琼脂等溶解在水介质中并且可与酶溶液混合形成凝胶。如果是明胶,这种酶-聚合物的混合物与水不混溶溶剂(通常是丁醇)混合而形成胶凝(van Velzen, 1974);如果是 κ -角叉菜胶,这种酶-聚合物的混合物在氯化钾水溶液存在的条件下冷却而制成凝胶(Tosa 等, 1979)。藻酸盐凝胶的制法是将酶的水溶液和藻酸钠与氯化钙的水溶液混合生成凝胶形式的藻酸钙-酶混合沉淀物(Schovers 和 Sandine, 1973)。在形成凝胶网络时,如使用有机溶剂或高盐浓度溶液,在某些情况下会使酶变性,这是由于保持酶活性至为重要的酶的三维三级结构受到永久性扭曲。

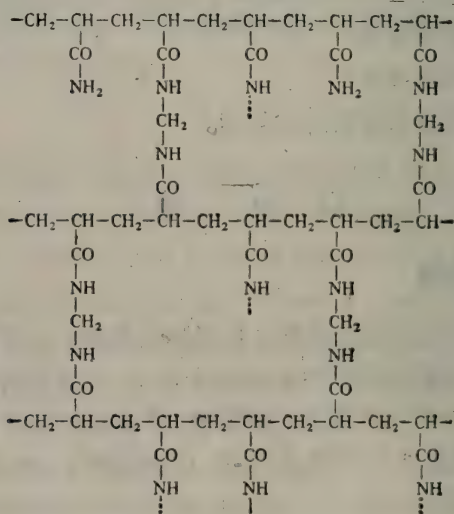


图 4.1 聚丙烯酰胺凝胶的结构示意图。

(……代表与纸面成直角的键,此键提供三维空间结构)。

4.2.2 纤维包埋

这种技术是把形成纤维的聚合物溶解在与水不混溶的有机溶剂中,然后与酶的水溶液形成乳化物。将此乳化物挤压入液体促凝剂(通常是甲苯或石油醚)中,促凝剂使聚合物以丝状形成沉淀,并使酶溶液微滴包埋在聚合物微空穴中(Dinelli 等, 1978)。此技术引起酶失活的主要原因是使用了水不混溶的有机溶剂,它使聚合物溶解和分散。

4.2.3 微型胶囊化

有许多方法可将酶包在球形半透性聚合物膜内(见A部分),这些方法又可再分为相分离法、界面聚合法、液体表面活性剂膜法和液体干燥法。下面分别讨论这些方法,并指出其优点和不足之处。

4.2.3.1 相分离法

这是酶微胶囊化最普通的方法(Campbell 和 Chang, 1975, 1976; Pain 和 Carbonell, 1975),是以物理凝聚现象为依据的。酶的水溶液在含有聚合物的水不混溶有机溶剂中乳化,在激烈搅拌这种含有聚合物-酶的乳化液的同时,加入另一种不含溶解聚合物的水不混溶有机溶剂。然后浓缩聚合物,在酶水解液微滴周围形成膜。尽管此法是在比较温和的条件下进行的,但是由于从聚合物膜中除去最后剩余的微量有机溶剂有困难,可能发生酶失活。

4.2.3.2 界面聚合法

这种制备微胶囊化酶的方法是以在微滴的界面上用化学方法合成水不溶的聚合物为依据。两种单体必须有不同溶解

度,即一种单体部分溶解于水溶液和有机相中(即亲水单体),另一种单体必须是只溶解在有机相中(即疏水单体)。亲水单体溶液和酶在有机溶剂中乳化,然后将溶于同样有机溶剂的疏水单体溶液加到乳化液中。通过缩合或加成聚合反应,在有机相和水相之间的界面上形成膜。此技术的典型实例是尼龙 6,10 胶囊化酶的制备 (Ostergaard 和 Martiny, 1973; Mori 等, 1973), 这是在氯仿-环己烷(1:4 体积比)溶液中加入疏水单体 1, 10-癸酰氯化物来制备的。

此法的主要缺点在于聚合前亲水单体可引起酶失活。

4.2.3.3 液体表面活性剂膜法

此法是在非永久性微胶囊中提供固定化酶,它以 Li (1971) 所发展的液体表面活性剂膜概念为依据。此法是采用酶溶液与表面活性剂乳化后形成液体膜胶囊化的酶来完成酶固定化的。

此法的主要优点是方法本身是非化学的,而且固定化是可逆的。然而,由于扩散作用也可能使酶损失,而且同一扩散现象是通过溶解度机理而不是通过分子大小的排阻机理来控制产物和底物通过液膜,这可能是不利的方面。

4.2.3.4 液体干燥法

此法和液体表面活性剂膜方法相似,产生一种永久性膜 (Kitajema 等, 1969)。所谓液体干燥法是把酶水溶液在一种沸点低于水的有机溶剂(通常是苯、环己烷或氯仿)中乳化来实现的。有机溶剂中也含有形成膜的聚合物和表面活性剂。然后将乳化液在含有保护性胶体物质(明胶、聚氯乙烯)和表面活性剂的水介质中分散,进行第二次乳化。除去有机溶剂,例如可采用旋转蒸发法,从第二次乳化中去有机溶剂,结果产

生微胶囊化酶。

这种方法的主要优点是采用了事先形成的聚合物,避免了由于单体相互作用所引起的酶失活。它的缺点是由于第二次乳化所存在的问题,使微胶囊的收率降低;另外,完全除去成膜所必需的有机溶剂需要的时间长。

4.3 载体结合

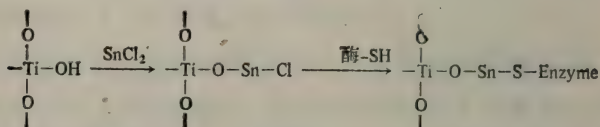
通过物理吸附或离子结合进行酶固定化不需要化学键,所以它不属于本章讨论的固定化方法的范畴。本书A部分第4章给读者提供了有关用这两种方法固定化酶必要步骤的详细论述。

4.3.1 螯合或金属结合

用过渡金属化合物激活支持物(通常采用氯化钛(IV)),最初的设想是制出含有活性的过渡金属螯合物的支持物,它们可通过取代而结合上酶,例如金属-氯化物键可以被酶分子中存在的基团取代,以使支持物与酶结合。已证明(Kennedy, 1979)过程中的洗涤阶段会导致金属化合物水解,产生相应的水合金属氧化物,而与形成固定化酶相关的羟基配体则被酶分子中的氨基、羧基、羟基等取代。

采用接触/洗涤操作在无机支持物上得到的结果不稳定,可以换用其他方法。这些方法包括支持物与氯化钛的酸性溶液迴流使无机支持物表面涂上一层不完全结晶的氧化钛(IV)从而活化无机支持物(Cardoso 等, 1978)。用这种方法产生的固定化酶的操作稳定性差,特别是加工高分子量底物时的操作稳定性更差(Flynn 和 Johnson, 1978)。这可采用其他化合物如氯化锡(II)(Messing, 1976)、5-氨基水杨

酸 (Kennedy 和 Chaplin, 1979) 或 1, 6-二氨基己烷和鞣酸或戊二醛 (Cabral 等, 1982 a, b) 等包裹氧化层来解决(见图解4.1)。另一种技术是在支持物与氯化钛 (IV) 接触后, 于 80°C 加热 1 小时 (Allen 等, 1979)。支持物经这些技术处理后, 水合金属氧化物就具有结合包括酶在内的生物活性物质的较大能力。



图解 4.1

水合氧化物凝胶作为支持物的制备, 而且不必加支持基质的酶固定化作为与氯化钛活化法不相关的技术, 提供了一种非常简单可行的方法。支持物是用氨中和过渡金属盐[通常是氯化钛 (IV)] 制备的, 结果生成聚合不溶凝胶(图 4.2; 4.3), 接着将酶螯合在生成的沉淀上。如果有酶存在, 有可能形成凝胶而不致使酶活性损失 (Kennedy 和 Kay, 1976)。如果在不溶性基质(如磁铁氧化物)存在时控制水解条件, 能够在基质上形成仍可与酶等结合的水合氧化物涂层(Kennedy

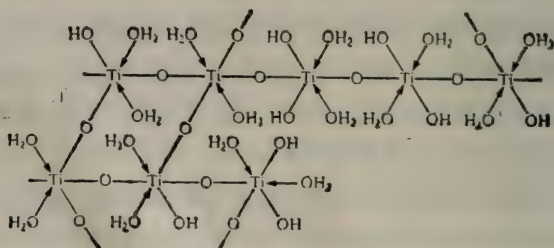


图 4.2 水合氧化钛 (IV) 示意图。

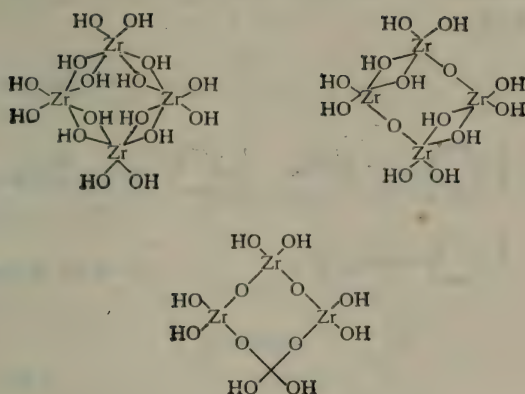


图 4.3 氢氧化锆的结构。

等,1977a, b; Kennedy 和 White, 1979)。

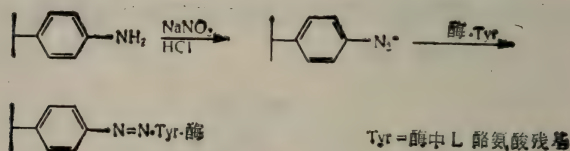
4.3.2 共价结合

正如 A 部分第 4 章所介绍的, 这种把酶连接到固体支持物上的方法是最老但又是使用最普遍的方法。由于酶是与高活性化合物接触, 一定要注意使条件尽可能温和, 以防止酶失活。

4.3.2.1 重氮化作用(见 A 部分)

这种方法的基本原理是酶蛋白与不溶支持物上的芳香重氮亲电基团之间形成重氮键, 含有芳香氨基的支持物在酸性溶液中用亚硝酸钠处理 (图解 4.2), 然后把活化的支持物与 L-酪氨酸的酚基或 L-组氨酸的咪唑基等芳族残基反应生成重氮衍生物(图解 4.2)。酶分子中的自由氨基 (来自 L-赖氨酸、L-精氨酸和 N 末端残基) 也可以参与反应(图解 4.3), 生成二取代的二重衍生物。一些含有芳香氨基的支持物列在表

4.1 中。其他许多支持物可通过事先将氨基引入它们的结构而用于此法。



图解 4.2



图解 4.3

4.3.2.2 酰胺键的形成

这个方法是通过酶分子中存在的氨基、羟基和巯基对活化支持物基质的亲核攻击形成酰胺键(肽键)。由于高 pH 值会造成酶不可逆变性,所以反应通常在接近中性进行,而不是在亲核效应最活泼的高 pH 值条件下进行。此法可采用不同类型活化支持物。

(a) 酸酐衍生物

通常是顺丁烯二酸酐共聚的酸酐衍生物(见 A 部分第 4 章,表 4.13)与酶的氨基(图解 4.4)反应形成羧基,它是酸酐环

表 4.1 含芳香氨基的支持物

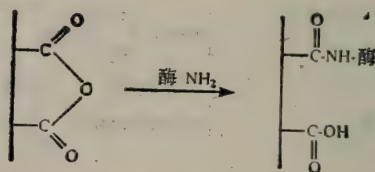
无机支持物	
多孔玻璃的芳香氨基衍生物	$\text{玻璃} \left[\text{O} - \text{Si} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH}_2 \right]$
有机支持物纤维素衍生物 3-(4-氨基苯氧基)-2-羟丙醚	$\left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH}_2 \right]$
4-氨基苯基	$\left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH}_2 \right]$
3-氨基苯氧甲基醚	$\left[\text{O} - \text{CH}_2 - (\text{O} - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_3(\text{NH}_2)) \right]$
4-氨基苯酯	$\left[\text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH}_2 \right]$
羧甲基醚的联苯胺衍生物	$\left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH}_2 \right]$
0-(3-氨基-4-甲氧苯) 磺酰乙基其他有机衍生物	$\left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SO}_2 - \text{C}_6\text{H}_3(\text{NH}_2)(\text{OCH}_3) \right]$
Enacryl® AA (商品名)	$\begin{array}{l} \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{NH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2 \end{array}$
聚氨基苯乙烯	$\left[\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2) - \text{CH}_2 \right]$

裂开的副产品。由于反应介质的 pH 值有利于自发离子化，这些羧基不与酶的功能基团反应。这种副反应使支持物产生不利的离子性质，但可在固定化反应中添加二胺化合物予以克服。这种添加会引起某种程度的交联，从而提高基质的稳

定性。

(b) 酰基叠氮衍生物

叠氮载体是由支持物基质制备的，这些基质含有羧基或羟基（图解 4.5），并且主要是与 L-赖氨酸、L-精氨酸和 N 末端的伯氨基反应（图解 4.6），当然在这样的条件下也可出现与脂肪族和芳香族羟基或巯基的反应。

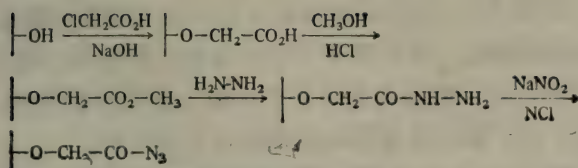


图解 4.4

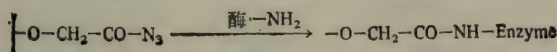
(c) 环状亚胺碳酸盐衍生物

Axén 等人 (1967) 建立的这种方法可能是实验室中应用最广的一种。支持物基质（通常是多糖，如葡聚糖、纤维素或琼脂糖）上的羟基与溴化氰反应生成有反应力的环亚胺碳酸（图解 4.7）。然后在微碱性（pH9—10）条件下，此反应产物与伯氨基反应，主要生成取代异脲衍生物（Wilchek 等，1975；Kennedy 等，1980a）（图解 4.8）。最近几年发表的文献证明（Kohn 和 Wilchek，1982）琼脂糖亚胺碳酸是与酶偶联的，从而解释了 Sepharose（基于琼脂糖）和 Sephadex（基于葡聚糖）的凝胶活化时的不同表现。

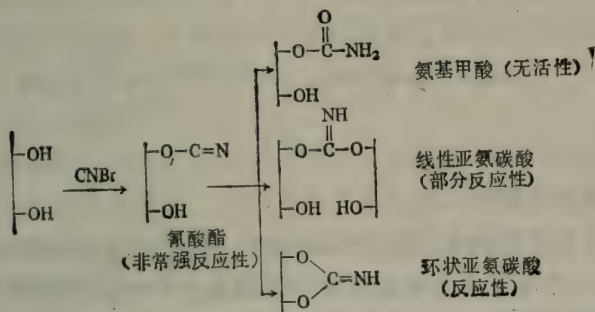
这个简单的方法却有许多不利之处，如溴化氰是剧毒的；衍生和偶联反应的 pH 值高及最终产物存在带电基团，会产生各种非专一性的干扰吸附。为弥补这些不足，已推出商品化的溴化氰活化多糖支持物，这样大大方便了许多实际工作者。



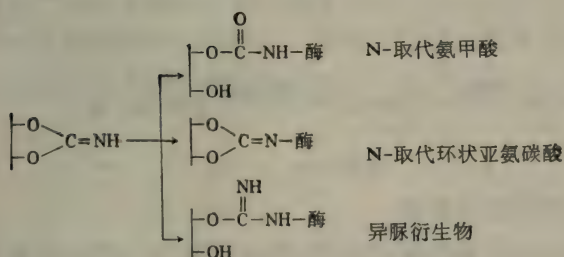
图解 4.5



图解 4.6



图解 4.7



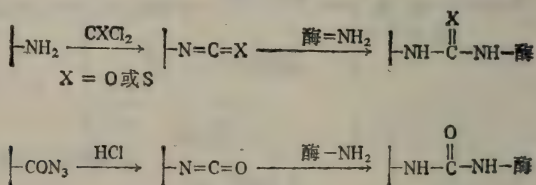
图解 4.8

(d) 异氰酸盐和异硫氰酸盐衍生物

在碱性条件下带有芳香氨和酰基叠氮基团的基质可用光

气或巯基光气加以修饰，分别生成异氰酸盐和异硫氰酸盐的衍生物(图解 4.9),然后再与酶等分子的伯氨基反应形成酰胺键或巯基酰胺键。蛋白质分子中的其他亲核基团如巯基、咪唑基、芳香羟基和羧基也会反应产生较不稳定的衍生物,它们在微碱性 pH 值或其他亲核试剂存在下会分解。

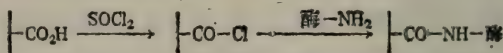
异硫氰酸衍生物比相应的异氰酸衍生物稳定,而且也可以用带有脂肪族氨基的基质制得,因此应用更为普遍。



图解4.9

(e) 酰氯衍生物

含有羧基的支持物如 Amberite IRC-50 (Brandenberger, 1956), 可通过在亚硫酸氯溶液中迴流支持物的方法活化。生成的酰氯(图解 4.10)可在低温下与酶反应生成稳定的固定化酶。

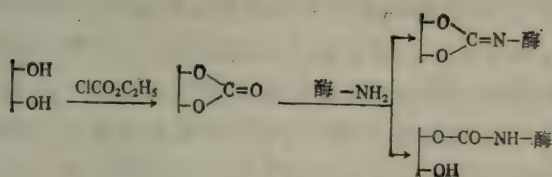


图解4.10

(f) 环碳酸盐衍生物

含有羟基的基质如多糖和聚-烯丙基醇,在 pH7—8 含有二氯六环和三乙醇胺的无水二甲亚砜溶液中,与乙基氯甲酸反应 (Barker 等, 1971)生成环状碳酸盐衍生物(图解 4.11)。它以与环亚胺碳酸衍生物同样的方式与酶的伯氨基反应,通

过形成 N-取代亚胺碳酸和 N-取代碳酸衍生物, 制成固定化酶(见图解 4.11)。



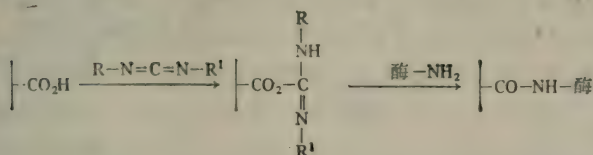
图解 4.11

和环亚胺碳酸法比较, 这种方法费用低, 操作简单, 也不用有毒化学试剂。但是还不如溴化氰活化方法那样得到普遍应用。

(g) 缩合剂

氧化的支持物可以通过碳二亚胺和相似的试剂进行活化。在微酸性条件下, 碳二亚胺反应生成 O-酰基异脲衍生物, 它可以通过与酶的伯氨基(图解 4.12)或与羟基或巯基反应而与酶偶联起来, 只是后者的反应速度大大低于氨基反应。

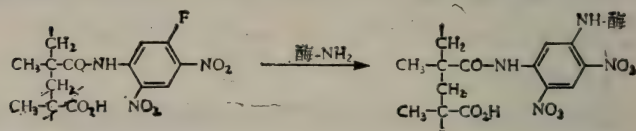
用含有氨基或胍基团的支持物进行的同样类型的反应, 提供了一种支持物羧基与酶结合的方法。这种方法是将载体和缩合剂同时加入酶溶液。固定化是通过载体基质的氨基和酶的羧基形成酰胺键而实现的。



图解 4.12

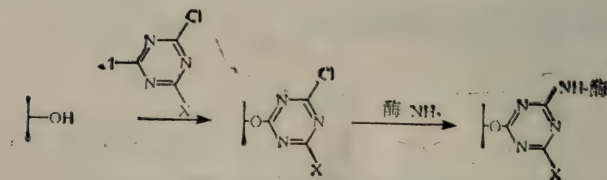
4.3.2.3 烷基化和芳香基化

酶分子中的氨基、巯基和芳香羟基可以与含有活性的卤化物、环氧乙烷、乙烯磺苯基或乙烯酮基的活性支持物反应，这是烷基化或芳香基化固定酶方法的基础。所用的反应性最强的支持物中的一种，不需要预先活化的支持物可以采用甲基丙烯酸和甲基丙烯酸-5-氟-2,4-二硝基酰替苯胺共聚制备出来。这种含有氟取代芳香环的支持物通过芳香基化与酶的伯氨基反应(图解 4.13)。



图解 4.13

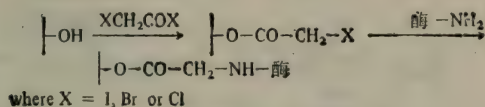
反应性低一些的支持物可使用 2,4,6-三氯对称-三氮杂苯或它的衍生物(例如 2-氨基-4,6-二氯-对称-三氮杂苯)与多糖(如纤维素)或无机物(如膨润土)反应，然后再与酶分子中的伯氨基反应进行制备(图解 4.14)。



图解 4.14

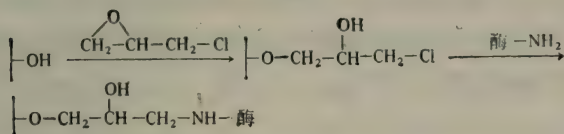
活性烷基卤基团可通过单卤乙酰基卤化物作用引入含羟基的支持物 (Jagendori 等, 1963)。使用碘作为卤化物所生

成的支持物,反应性和稳定性最好。但使用氯却不利,这是因为酶偶联过程中会产生竞争性水解反应,结果使带负电荷的羧基进入支持物。这些活化的支持物虽也会与巯基那样的亲核基团反应,但主要是使酶分子中的氨基烷化(图解 4.15)。



图解 4.15

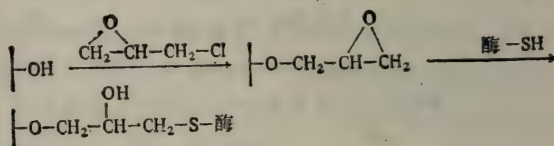
这种烷基化方法的主要缺点是酶和载体之间的脂键有时不够稳定,不足以满足大规模使用时对稳定性因素的要求。如果支持物基质是在三氟化硼乙醚存在的条件下与二卤素酮或环氧氯丙烷反应,所形成的键就较稳定(图解 4.16)。



图解 4.16

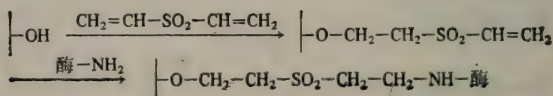
另一种可供选择的酶烷基化途径是采用含高张力的三元亲电环状系统,它包括氧(取代的环氧乙烷)、硫(取代的乙烯硫化物)或氮(取代氮丙啶)。由于环氧环的反应性使得这个系统效果较好,而含硫同类物由于其固有的稳定性则效用最差。支持物用环氧氯丙烷活化(图解 4.17),残基上的环氧基依次再与巯基、氨基和羟基等酶的亲核基团反应。环氧基或巯基的亲核攻击发生在中性 pH 条件下,而对于脂肪族羟基的攻击需要更强的碱性介质 (pH 11)。芳香羟基(来自 L-酪氨酸)、胍基(来自 L-精氨酸)和咪唑基(来自组氨酸)也参加反

应。尽管支持介质和酶之间的键是非常稳定的，并且没有引入作为副产物的、会引起非专一性干扰吸附的不利带电基团 (Murphy 等, 1977)，但这种方法也不是很理想的，因为它需要延长反应时间(几天或几周)。



图解4.17

在碱性介质中载体的羟基用二乙烯基砜活化 (Porath, 1979)，使载体对酶分子中巯基、氨基和羟基的亲核攻击敏感 (图解 4.18)。反应性的顺序和环氧化物的反应顺序相同，但是反应速度比较高。主要缺点是用在 pH 值低于 8 的溶液中不稳定，因为在这样的条件下会使乙烯砜配基慢慢释放出来。只要材料可以在碱性溶液中使用，载体可以同时交联，从而改进性质 (Porath 等, 1975)。

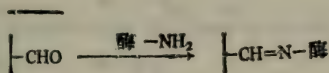


图解4.18

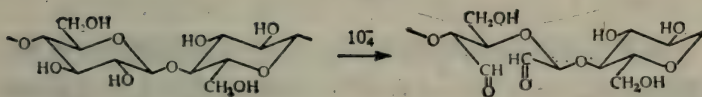
4.3.2.4 希夫碱的生成

活化载体上的羧基和酶分子上的自由氨基反应 (图解 4.19) 形成希夫碱(亚氨醛键)，已经用来作为酶固定化的方法。含有醛基的支持物能够从合成聚合物制备出来，例如 polyacrylaylamino 乙醛(酸与 Enzacryl 聚缩醛作用) (Epton 等，

1972), 烯丙醇与香子兰醛甲基丙烯酸盐的共聚物 (Brown 和 Racois, 1972), 或用天然多糖类支持物(如纤维素)与过碘酸(图解 4.20), 或二甲基亚砷及乙酰反应 (Weakley 和 Mehltre-
atter, 1973) 来制备。在正常温度下, 水溶液中多糖类会出现迅速氧化, 通过分子扭曲而使两点结合, 导致两个醛功能团接近, 这样会使酶失活。



图解 4.19



图解 4.20

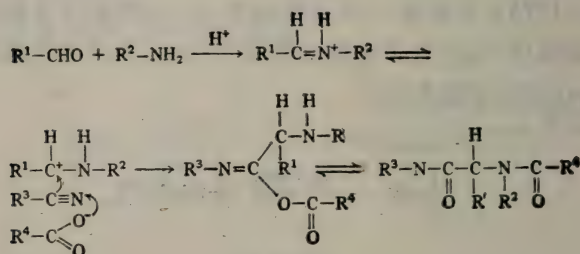
含有氨基的支持物可与戊二醛反应形成含有活性醛基的基质。虽然通常用戊二醛来交联酶, 但在这里是假定一个醛基与固体支持物反应, 另一个通过希夫碱的形成与酶反应。当然这种反应机制不是完全清楚的(见后第 4.4 部分)。

通过希夫碱形成作为酶固定化方法, 其主要缺点在于低 pH 条件下反应具有可逆性; 这个缺点可以采用硼氢化钠还原亚氨基生成更稳定的烷氨基键来克服。

4.3.2.5 Ugi 反应

1962 年 (Ugi, 1962) 第一次提出了四种功能基团 (羧基、氨基、醛基和异氰酸基) 同时反应形成 N-取代酰胺的过程。羧基和含氨基化合物反应生成的质子化希夫碱一起加入异氰化物物和一种阴离子, 会生成一种三元加成化合物。如果

这种阴离子是羧酸盐,会产生分子间的重排,生成 N-取代酰胺(图解 4.21)。

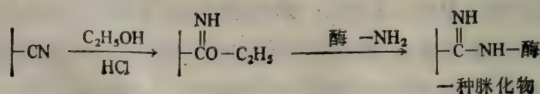


图解 4.21

这种反应若在酸性介质中进行,条件会温和到能适用于酶的固定化。由于可以从含有四种功能基因的支持物基质中任意选择, Axén 和他的同事使此方法最优化,并成为适用范围广泛的方法 (Axén 等, 1971; Vretblad 和 Axén, 1971)。这样就有可能通过酶分子上的氨基或羧基采用含有醛基或异氰酸基的支持物(在水溶液存在条件下)。尽管 Ugi 反应形成三元加成复合物会降低收率,但是它却为活性醛载体的使用提供了多种选择。

4.3.2.6 脒基化反应

含有氰基的支持物在乙醇中用干燥氯化氢活化,生成容易被亲核基团作用的亚胺酯衍生物(图解 4.22)。碱性 pH 条



图解 4.22

件下,亚胺酯衍生物有选择地与酶分子氨基反应生成脒化物,它在中性和酸性溶液中稳定,而在高 pH 溶液中会慢慢水解。

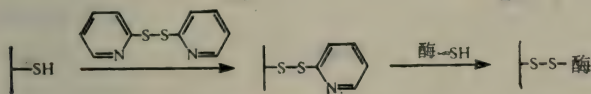
脒基化反应也可以发生在溴化氰活化的含氨基支持物和酶分子氨基之间,从而在酶与载体之间生成脒基键(图解 4.23)。



图解 4.23

4.3.2.7 巯基-二硫化物相互转变

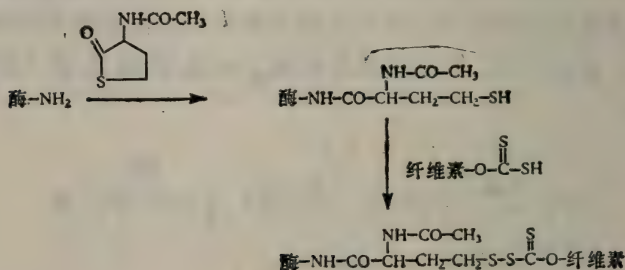
在酸性溶液中,酶中的巯基和载体基质(如 Enzacryl polythiol 和聚巯基丙酮或纤维素黄原酸酯)中的巯基形成二硫键,这可用将酶固定化(Borlazza 等,1980)。这种支持物首先通过与 2,2-二吡啶二硫化物反应加以活化。此二硫衍生物再与酶中巯基反应并放出 α -巯基吡啶酮(图解 4.24)。这种方法生成的固定化酶仅在非还原条件下稳定,低分子量巯基化合物可使固定化逆转。



图解 4.24

另一种方法由于使用更易反应的酶分子氨基,不仅方法的适用范围更广泛而且引进一个间隔臂,这可以减少由于固定化引起的酶分子三级结构的破坏(Kennedy 和 Zamir, 1975)。在氧化条件下与巯基化支持物偶联之前,酶分子中的氨基要用 N-乙基同型半胱氨酸-巯基内酯活化(图解 4.25)。在还原条件下这个反应的逆反应的特性已利用来使载体再生

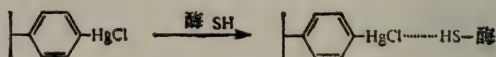
和使固定化酶复活。



图解4.25

4.3.2.8 汞-酶相互作用

此方法是基于含汞衍生物的载体与酶中巯基的相互作用(图解 4.26)。在 pH4—8 时形成的键不是纯共价键,因此这种方法被一些研究者看作为物理吸附。低分子量的巯基试剂可使固定化逆转。

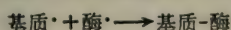


图解4.26

4.3.2.9 γ 辐射诱导的偶联

在琼脂类和葡聚糖这样的载体存在条件下,用 γ 射线照射酶已作为固定化酶的手段 (Brandt 和 Anderson, 1976)。照射使载体和酶均产生自由基,自由基的结合产生共价键(图解 4.27)。

此方法的主要缺点是无专一性,得率低,以及由于照射损害引起的酶活性损失大。其优点是不受温度和 pH 的限制。



图解4.27

4.3.3 载体结合的基质

作为酶固定化基质的固体支持物可以按表 4.2 分类。正如 A 部分第 4 章中指出的那样,支持物性质影响固定化酶的活性、稳定性和动力学。因此研究工作者需选择适应于特定应用的专一性更强的支持物,而工业应用则要考虑到原料和技术的经济效益,如象无毒性,对微生物的抗性,重复使用性和易于控制等特性也是很重要的。

4.3.3.1 无机支持物

固定化酶的最早期工作是使用无机支持物,以及它们所具有的对酶的物理吸附能力,但是有机聚合物的应用越来越广泛,因为酶容易以化学的方式与它们结合。目前人们的兴趣又转回到无机支持物,这不仅是出于经济上的考虑,也是由于它们的物理性质有许多优于有机支持物之处:

机械强度高;

热稳定;

抗有机溶剂;

抗微生物侵蚀;

容易操作;

货架寿命长;

通过热裂解容易再生。

许多无机支持物还具有在宽的 pH、温度和压力范围内不改变其结构的优点。

多孔材料具有表面积与单位重量比高的显著优点,这将

表 4.2 载体结合方法固定化酶的基质

类 型	实 例
无机物	
天然存在的物质	美国活性白土 膨润土 硅藻土 角闪石 硅藻土 (Kieselguhr) 浮石 砂
人造的物质	矾土 硅酸铝 可控多孔玻璃 水合氧化钛 氧化磁铁 镍 硅石 硅铬 不锈钢 钛 氢氧化铝
有机物	
天然多聚物	
多糖	琼脂糖 藻酸 纤维素 几丁质 聚氨基葡萄糖 葡聚糖 菊粉 果胶酸 淀粉
蛋白质	胶原

表 4.2 (续)

类 型	实 例
炭	蚕丝 活性炭
合成的多聚物	
聚苯乙烯	聚苯乙烯
聚丙烯酸酯类	聚丙烯酰胺 聚丙烯酸 聚丙烯腈 聚缩水甘油甲基丙烯酸 聚羟烷基甲基丙烯酸 聚甲基丙烯酸 聚甲基丙烯酸酐
顺丁烯二酸酐共聚物	乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物
多肽类	4-氨基- DL-苯丙氨酸/L-亮氨酸共聚物
乙烯多聚物	聚(乙烯醇) 聚(乙烯胺)
烯丙基多聚物	聚(烯丙基醇)
多胺类	尼龙

会使酶的载量高;而且大部分酶固定在内表面,可防止处在外表面的高流速湍动,特别是工业化的反应器中湍动更甚的影响。孔径的大小不仅要能容纳酶,也要有足够的空间使酶的底物和产物分子容易靠近。因此,孔径大小分布宽的载体只有一部分有足够大的孔,因此只有总表面积的一小部分区域是有效的。发展能控制孔径大小的载体有助于解决这个问题,即通过生产出不同孔径大小的支持物,向特定的酶系统提供最大使用表面。必须指出孔径越大,可使用的表面越小。

(a) 孔径受控制的支持物

孔径受控制的多孔玻璃,可采用加热硼硅玻璃 500—700°C,经相分离而制备。然后用酸溶解硼酸盐部分,留下孔

径大小相似的多孔支持物。这种控制孔径的多孔玻璃不适合工业上使用,因为它价格高 (Messing, 1974) 并且在连续流动系统中长期使用时会浸溶出硅,特别是碱性介质中稳定性差。已采用各种方法解决这种稳定性问题,可将多孔玻璃在真空条件下浸在锆盐中,然后煅烧氧化使其表面覆盖一层氧化锆 (Tomb 和 Weetall, 1979)。

由硅、铝和钛制的多孔陶瓷 (Messing, 1975) 也得到开发使用,它比多孔玻璃便宜。但根据特殊过程选择何种支持物时应注意它们的化学耐受性。钛和铝在碱性条件下应用更合适,而硅在酸性溶液中较适用。

(b) 其他多孔支持物

自然界存在的多孔矿物如美国活性白土 (attapulgite clays) (Burns, 1976)、膨润土 (Monsan 和 Durand, 1971)、硅藻土 (Greenfield 和 Lawrence, 1975) 和浮石 (Cabral 等, 1981a) 都已用来做酶固定化的载体。但是它们的孔径大小范围广,降低了使用的适应性。

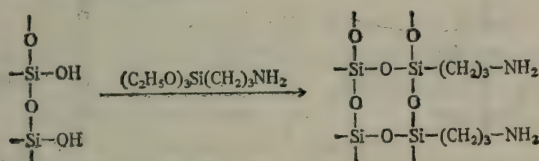
(c) 无孔支持物

无孔支持物的主要缺点是单位重量的表面积小,可采用微细颗粒来弥补这个缺点。由于需要高压,在连续反应器中使用没有吸引力;又由于不容易从溶液中回收,批式使用中 also 缺乏吸引力。它的主要优点是能够降低或除去对底物的扩散限制,但这个优点不足以与多孔支持物的其他许多优点媲美。近年来对使用纯金属和金属氧化物的兴趣越来越大,这些材料具有铁磁性质,包括镍 (Chaplin 和 Kennedy, 1976)、不锈钢 (Charles 等, 1975) 和磁氧化铁 (Kennedy 等, 1977b, Kennedy 和 White, 1979)。在这些支持物上固定化的酶容易从含其他不溶物的混合物中分离出来。这些铁磁性物质在酶的免疫测定系统中也有其应用。

出于经济上的考虑，砂子作为无孔支持物也引起人们的兴趣 (Brotherton 等, 1976)。

4.3.3.2 无机支持物的偶联反应

无机支持物不够活泼，进行共价偶联是困难的。所有的方法都采用三烷基硅烷衍生物，它含有有机功能基团如脂肪或芳香氨基、卤素、醛或缩醛基，在酶与支持物之间形成共价键。无机支持物硅烷化的早期工作是由 Weetall 和其同事 (Weetall, 1976) 进行的，他们使用 3-氨丙基三乙氧硅烷(图解 4.28)将氨烷基引入多孔玻璃，其机理是硅烷的三乙氧基被玻璃氧化表面的羟基取代。



图解 4.28

一旦基质的硅烷衍生物生成，就可应用于本章谈到的所有含有氨基支持物的方法。反之，氨基可被转换为其他基团，例如重氮基、醛基、异硫氰基、羧基或烷基叠氮。

无机支持物的另一种活化方法是在玻璃等材料表面用钛涂层，干燥后可与二胺反应生成烷基胺衍生物 (Cabral 等, 1981b, 1982a) (图解 4.29)。这种方法操作更简单，生成的衍生物与硅烷化方法的衍生物相似，所得的固定化酶操作稳定性也可以与硅烷化方法相比 (Cabral 等, 1982b)。

玻璃或其他无机支持物的环状亚氨碳酸衍生物可通过溴化氰制备(图解 4.30) (Weetall 和 Detar, 1975); 另一种方法是采用巯基或磺酰氯制备砖、膨润土和玻璃的氯化衍生物来活化无机支持物，以便能够与酶共价结合。

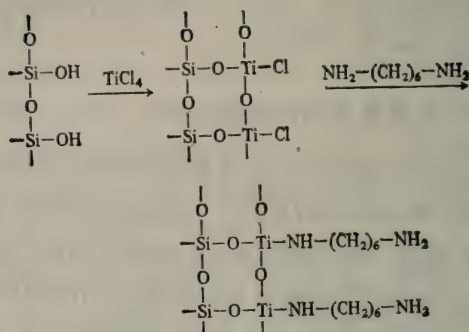
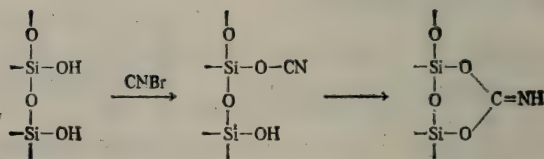


图 4.29



图解4.30

与无机支持物相反，可以得到具有大量各类功能基团的有机支持物。有机支持物的分类列于表 4.2,天然聚合物可包括多糖、蛋白质和碳,制备的合成聚合物可以具有亲水或疏水特点。亲水支持物优于疏水支持物,因为后者对酶的稳定性有影响;合成聚合物优于天然存在的物质,因为它对微生物的侵蚀抗性更强。

(a) 多糖

许多多糖用来作为酶固定化的支持物,最重要的是纤维素、葡聚糖和琼脂糖。从经济上考虑,采用淀粉及其成分、直链淀粉和支链淀粉是有吸引力的,但它们易被微生物侵蚀。近年来一些其他的多糖也利用来作为支持物,有些多糖中氨基或羧基作为结构的一部分。这些多糖的结构特征列于表 4.3。

表 4.3 用于固定化酶支持物的一些多糖结构

多 糖	结 构
琼脂糖	(1→3)连接的 β -D 吡喃半乳糖和(1→4)连接的 3,6 脱水- α -L- 吡喃半乳糖基的共聚体
藻酸	(1→4)连接的 β -D 吡喃甘露糖醛酸和 (1→4) 连接的 α -L-吡喃古洛糖醛酸基的共聚物
直链淀粉	(1→4)连接的- α -D 葡萄吡喃糖基的共聚体
支链淀粉	伴有(1,4,6)三元取代基的支链结构(1→4)连接的- α -D 吡喃葡萄糖的多聚体
纤维素	(1→4)连接的 β -D-吡喃葡萄糖多聚体
几丁质	(1→4)连接的 2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-吡喃葡萄糖基多聚体
聚氨基葡萄糖	2-氨基-2-脱氧 β -D-吡喃葡萄糖基
葡聚糖	伴有(1,3,6)三元取代基的支链结构(1→6)连接的 α -D-吡喃葡萄糖基
菊粉	(2→1)连接的 β -D-呋喃果糖基的多聚体
果胶酸	(1→4)连接的 α -D-吡喃半乳糖醛酸基的多聚体
果胶	(1→4)连接的 α -D-吡喃半乳糖醛酸基 (许多以甲酯形式存在)的多聚物
淀粉	直链淀粉和支链淀粉的混合物

多糖的羟基可直接引入亲电基团来活化,此基团可与酶分子反应。多糖的亲核性很弱,它的偶联活化(直接偶联)或偶联前活化(间接偶联)需要引入侧基。采用多糖的一些羟基已制备出一些活化衍生物(见表 4.4),而剩余的羟基提供保护固定上的酶的亲水环境。

(b) 蛋白质

酶固定化中无酶活性的蛋白质作为支持物主要用在与胶原蛋白的络合 (Vieth 和 Venkatasubramanian, 1976),酶包埋在明胶的基质中 (van Velzen, 1974),或者酶与无酶活性蛋白(如清蛋白)交联在一起。有一些报道提到采用无活性蛋白,如胶原蛋白和直接用蚕丝作支持物 (Coulet 等, 1975; Grasset 等, 1979)。

表 4.4 酶固定化的活性多糖

衍生物	原基质中需要的基团	活性剂	参考文献
直接偶联			
溴乙酰	羟基	溴乙酰溴	Maeda 和 Suzuki (1972)
氯烷基	羟基	表氯醇/三氟化硼醚	Alme 和 Nystrom (1971)
二醛	连二醇	高碘酸盐	Glassmeyer 和 Ogle (1971)
环氧	羟基	表氯醇	Murphy 等 (1977)
亚氯碳酸	连二醇	溴化氰	Meada (1978)
反-2,3-碳酸	连二醇	氯甲酸乙酯	Kennedy 和 Zamir (1973)
三氮苯基	羟基	2,4,6-三氯-对称-三二乙 烯砜	Shimizu 和 Lenhoff (1979)
乙烯砜	羟基	二乙烯砜	Porath (1979)
间接偶联			
叠氮化物	羟基	肼/亚硝酸/酸	Mitz 和 Summaria (1961)
三偶氮	氨基	亚硝酸/酸	Beddows (1980)
异氰酰	氨基	光气	Maeda 等 (1978)

胶原蛋白是高等脊椎动物最丰富的蛋白组分，它可以从鱼到牛这样广泛的动物种取得，是一种价钱贵的载体。它易于分离和重组各种形式而不改变其天然结构，与它固有的疏水性以及伸展开的内部结构共同提供高浓度的结合位点，在水溶液中纤维状结构具有高膨胀性，使之成为理想的酶固定化载体。最近提出了采用共价法技术 (Coulet 等, 1980)，即用胶原蛋白的叠氮衍生物来固定一些酶。

自然状态的丝含有两种蛋白质：丝心蛋白是水不溶的，丝胶蛋白是水溶的。以纺织工业用的丝作为酶支持物。它的优点是容易操作，疏松，抗磨损，再加上它固有的热稳定性，在 pH3—8 之间的抗酸碱性，以及对微生物的抵抗能力。在丝与酶共价结合之前一定要活化，这就需要对可用的功能基团有所了解。已报道了几种方法，最有效的是采用叠氮衍生物

(Carlsson 等, 1974)。它是利用丝心蛋白分子中的羧基, 通过酸性甲基化, 然后经胍和亚硝酸作用, 制得活化叠氮丝。甲基化丝也已作酶物理吸附的支持物。

(c) 炭

炭材料是价格上经济的、机械强度好的固定化酶的支持物, 已能制得各种形式的支持物, 包括多孔的。最常用的炭材料是活性炭, 它是多孔的, 同一结构内具有三种类型的孔(微型孔, 直径 0—0.4nm; 过渡型孔 5—100nm; 大孔 100—4000 nm), 其表面具有活性基团, 包括芳香羟基和羧基。许多报告提到炭材料用于物理方式吸附酶, 而这些活性基团的存在会使化学反应引向酶的共价结合 (Cho 和 Baily, 1978, 1979)。羧基可用炭二亚胺活化, 而氨基炭可通过剧烈地氧化、硝化, 然后是二硫化物还原的方式得到。氨基炭中的氨基接着可转为异硫氰酸基(用巯基光气), 然后接着用3-氨基丙基三乙氧基硅烷使之硅烷化。炭的重氮化衍生物可以从氨基和异硫氰酸-炭制备。

(d) 聚苯乙烯

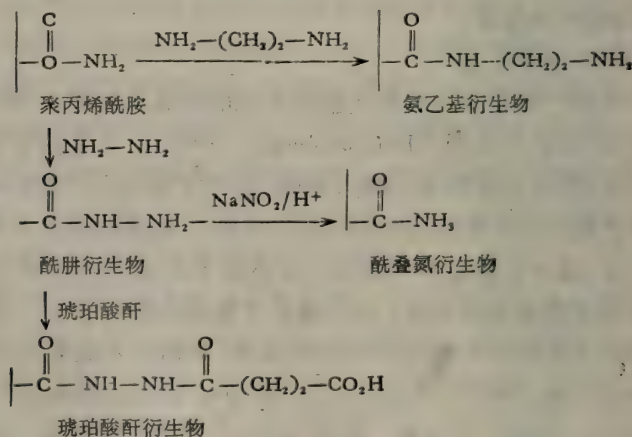
聚苯乙烯是第一种用在酶固定化的合成聚合物, 因为它容易得到, 价格又低 (Brandenberger, 1955)。为了使它能共价结合, 需要生成聚苯乙烯衍生物, 这个主要中间产物是聚氨基苯乙烯, 它是采用硝化和还原产生的。氨基的活化采用氮化方法, 或者用巯基光气或戊二醛还原生成, 但是这样产生的聚合物所固有的疏水性, 使活性固定化酶的收率低下。苯乙烯与亲水单体如丙烯酸、甲基丙烯酸、3-氟苯乙烯和 3-异硫氰酸苯乙烯共聚, 以少量二乙烯苯为交联剂 (Manecke 和 Förster, 1966; Manecke 和 Gunzel, 1967), 这样可以解决疏水性问题, 使聚苯乙烯的应用出现新的高潮。

(e) 聚丙烯酸盐

在包埋法和共价结合法固定化酶所采用的合成聚合物中丙烯酸聚合物是最广泛采用的一种。它容易制得许多衍生物(见表 4.5),某些衍生物可与酶直接偶联,其中许多种(如聚丙烯酰胺和聚甲基丙烯酸盐)已有商品供应。这些衍生物用来把反应基团引进聚合物或用来调节疏水性。当亲水性增加到一定程度,线性聚合物是水溶性的,必然加入具有双功能基团物质,如 N,N-亚甲基-双丙烯酰胺,进行交联使其具有不溶解性。

表 4.5 用于酶固定化的一些丙烯酸多聚物

多聚物	反应基团	参考文献
丙烯酸/丙烯酰胺	氨基、羧基	Torchilin 等 (1977)
甲基丙烯酸/丙烯酰胺	氨基、羧基	Torchilin 等 (1977)
丙烯酸/丙烯醛	醛基、羧基	van Leemputten (1977)
甲基丙烯酸酐	酸酐	Conte 和 Lehmann (1971)
丙烯酰胺共聚物	各种基团	Epton 和 Thomas (1971)

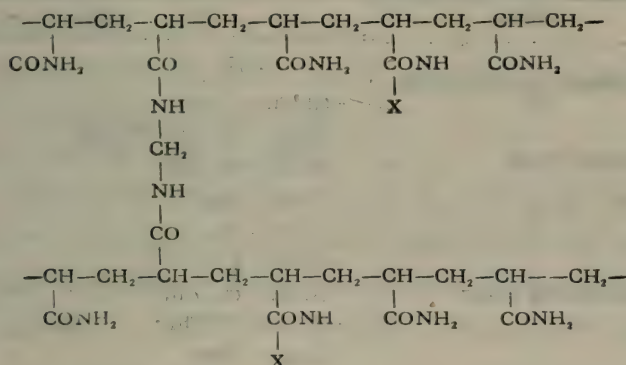


图解4.31

通过许多方法可活化聚丙烯酰胺以提供直接偶联的支持

物,这些方法(图解 4.31)可给出酰基肼、氨基基、琥珀酰肼和酰基叠氮的衍生物。氨基基衍生物和聚丙烯酰胺本身也可以用戊二醛活化,而在碳二亚胺存在下,琥珀酸酰肼和氨基基衍生物可分别与酶的氨基和羧基反应。

一些以亲水电中性丙烯酰胺为基础的聚合物已有商品供应,商品名是 Enzacryl 凝胶 (Koch Light 实验室),它们的使用和活化方法已有记述 (White 和 Kennedy, 1980)。这些支持物的主要结构特点列于图 4.4。一些相似的共聚物也



X=潜在活性功能基

潜在活性功能基	名称	活化剂
$\text{—NH—} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array} \text{—NH}_2$	EnzacrylAA	亚硝酸/H ⁺ 或硫化光气
—NH—NH_2	EnzacrylAH	亚硝酸/H ⁺
—NH—CH—CH_2 CO—S—	Enzacryl 聚硫代丙酸酐	无
$\text{—NH—CH—CH}_2\text{—SH}$ CO ₂ H	Enzacryl 聚硫醇	K ₃ Fe(CN) ₆
$\text{—NH—CH}_2\text{—CH(OCH}_3\text{)}_2$	Enzacryl 聚乙缩醛	H ⁺

图 4.4 Enzacryl 凝胶主要结构特征及其活化方式。

已经制备出来了(见表 4.6)。含有 2-羟乙基甲基丙烯酸共聚物相当于多糖支持物,因为它们的羟基含量相仿,并且也采用溴化氰活化(也有多糖中环亚胺基碳酸形成的类似过程),而丙烯酰胺和丙烯酸或甲基丙烯酸盐的共聚物(后者对于较疏水底物的反应有用)是采用碳二亚胺活化的。聚 4-和 5-丙烯酰胺水杨酸是 N 取代的酰胺,它可通过金属螯合来激活(Kennedy 和 Epton, 1973)。

表 4.6 用于酶固定化的一些丙烯酰胺共聚物

多聚物	结 构
丙烯酰胺/2-羟乙基甲基丙烯酸	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2- \\ \quad \quad \\ \text{CONH}_2 \quad \text{CO}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$
丙烯酰胺/丙烯酸	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2- \\ \quad \quad \\ \text{CONH}_2 \quad \text{CO}_2\text{H} \end{array}$
丙烯酰胺/甲基丙烯酸	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2- \\ \quad \quad \\ \text{CONH}_2 \quad \text{CO}_2-\text{CH}_3 \end{array}$
4-丙烯酰胺基水杨酸	$\begin{array}{cc} \text{CONH} & \text{CONH} \\ & \\ \text{C}_6\text{H}_3\text{OH} & \text{C}_6\text{H}_3\text{OH} \\ & \\ \text{CO}_2\text{H} & \text{CO}_2\text{H} \end{array}$
丙烯酰-N, N'-二(2,2'-二甲氧乙基)胺	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2- \\ \quad \quad \\ \text{CO} \quad \quad \text{CO} \\ \quad \quad \\ \text{N}[(\text{CH}_2)_2-(\text{OCH}_3)_2]_2 \quad \text{N}[(\text{CH}_2)_2-(\text{OCH}_3)_2]_2 \end{array}$
丙烯酰-N, N'-二(2,2'-二甲氧乙基)胺/丙烯酰基吗啉	$\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2- \\ \quad \quad \\ \text{CO} \quad \quad \text{CO} \\ \quad \quad \\ \text{N}[(\text{CH}_2)_2-(\text{OCH}_3)_2]_2 \quad \text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{---} \quad \text{---} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \end{array} \end{array}$

一些性能很接近的产品可以采用丙烯酸-N-N'-二(2,2'-

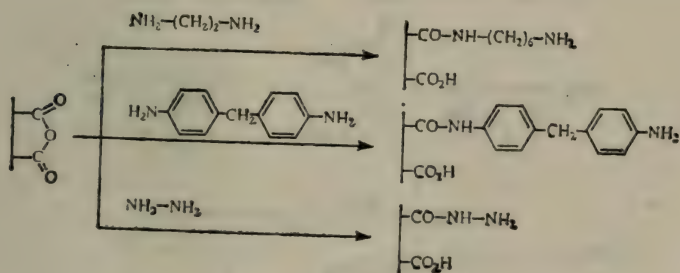
二甲氧乙基)胺(Epton等,1975)聚合或与N-丙烯酰吗啉共聚获得,其中有的产品已有商品供应,商品名是 Enacryl 凝胶(Epton 等,1979)。这些支持物用酸水解,然后在酸性溶液中与亚硝酸钠反应进行活化。

聚缩水甘油甲基丙烯酸盐是缩水甘油甲基丙烯酸盐与丙烯酰胺的共聚物(Krammer 等,1976),其中含有与自由氨基反应(如果不在冷处贮存,它也可与聚合物中的酰胺基反应)的环氧乙烷(环氧化物)。如果不用丙烯酰胺,而改用乙烯二甲基丙烯酸盐也可得到相似产品。这些材料是酶固定化的很有前景的支持物(Svee 等,1978)。

聚丙烯腈用甲醇化的氯化氢活化,产生的亚胺酯衍生物可通过共价键与酶的自由氨基结合。

(f) 顺丁烯二酸酐基共聚物

这类支持物最常见的例子(Levin 等,1964)是顺丁烯二酸与乙烯,与二胺类交联(它也用来中和固定化反应中产生的负电基团)的共聚物。可用许多方法对生成的共聚物进行各种修饰(见图解 4.32),以便提供与酶偶联的其他供选用的方法。

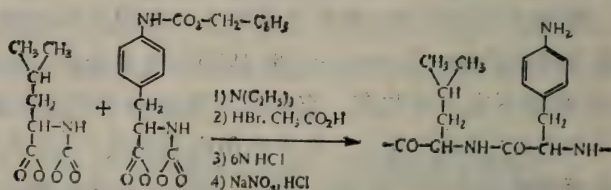


图解 4.32

(g) 多肽

水不溶多肽已广泛用于酶的固定化,其中 L-亮氨酸和

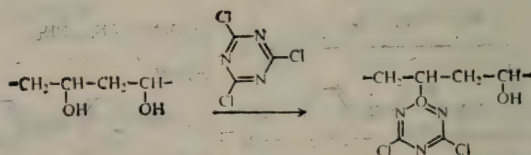
4-氨基-DL-苯丙氨酸共聚物是最常用的 (Engel 和 Alexander, 1971)。此聚合物是 4-N 苄氧碳酸酐- α -N-羧基-D-L-苯丙氨酸酐和 N-羧基-L-亮氨酸酐共聚制备的 (图解 4.33), 用酸性亚硝酸钠活化。



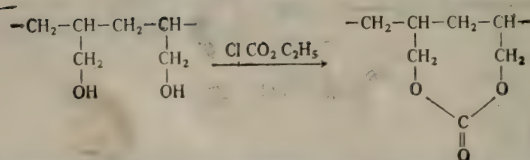
图解 4.33

(h) 乙烯和烯丙基聚合物

与多糖具有相似性质的非生物降解支持物已用聚乙烯醇、聚乙烯氨、聚乙烯醚或聚烯丙基醇制备出来。这些高聚物的活化方法与多糖和聚乙烯醇的活化法相似,是用 2,4,6-三氯-对称-三氮杂苯(图解 4.34)活化(Maneck 和 Vogt, 1976),聚烯丙基醇可用乙基氯甲酸活化(图解 4.35),生成环状碳酸衍生物 (Kennedy 等, 1972)。



图解 4.34



图解 4.35

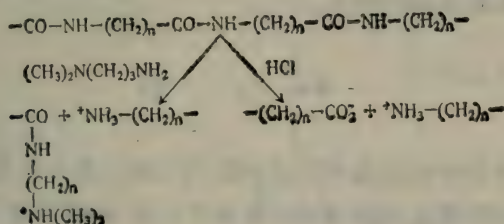
(i) 聚酰胺类

以 α, ω -二胺和 α, ω -二羧酸 (或它们的二酸氯) 的缩合聚合物所产生的合成聚酰胺类, 一般称为尼龙。不同类型的尼龙差别仅在于重复结构中亚甲基的数目。尼龙可以不同的方式提供, 包括粉末、纤维、中空纤维、管和膜。作为酶固定化的支持物具有机械强度好、生物抗性强和较疏水等优点。由于高聚物骨架不活泼, 需要经活化来增加其结合能力, 其方法是:

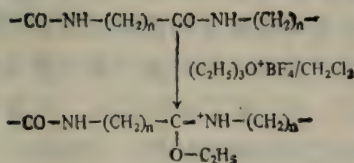
(i) 用酸水解使其产生部分解聚 (图解 4.36), 然后活化生成的氨基或羧基。

(ii) 通过 O-烷基化引入反应中心, 以产生亚胺衍生物 (图解 4.37)。

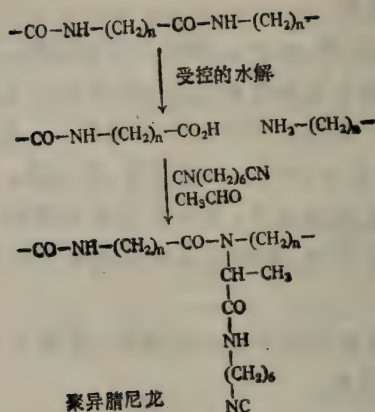
(iii) 微酸性情况下解聚, 先以 N-烷基化的方式, 然后把氨基和羧基与醛和异氰化物缩合 (图解 4.38) 引入反应中心, 形成聚异丙烯腈尼龙 (Goldstein 等, 1974)。酶通过 Ugi 反



图解 4.36



图解 4.37



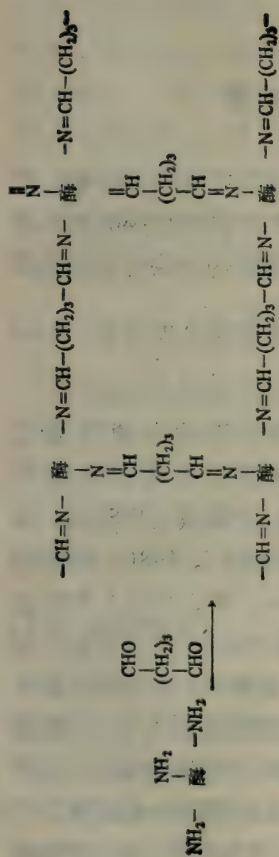
图解4.38

应结合在异氰化物基团上，或者异氰化物基团被修饰成其他功能形式。

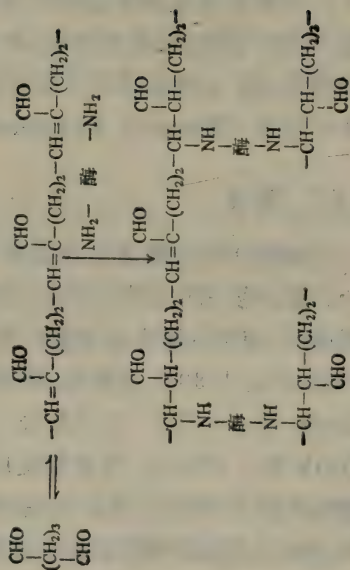
应用尼龙的主要缺点是它的结构必须修饰，它所具有的活化形式的表面积较小。

4.4 交 联

分子内交联最通用的试剂是戊二醛。最初认为其机理是涉及试剂的醛基与酶分子的氨基形成希夫碱(图解 4.39),但这个键对 pH 和温度极其稳定,因此提出(Richard 和 Knowles, 1968),反应包括把酶的氨基共轭添加到常用商品戊二醛溶液中存在的 α , β -不饱和寡聚体的乙烯双链上(图解 4.40)。在发现新配制的蒸馏过的戊二醛对蛋白质的反应性远远低于商品的反应性现象后,更证实了这种看法。不溶复合物的形成严格地依赖于酶和试剂的相对浓度以及溶液的 pH 值和离子强度 (Brown, 1976)。蛋白质的最适浓度是 50 和 200mg/



图解4-39



图解4-40

ml, 戊二醛的最佳浓度是 0.3% 和 0.6%。当试剂对酶的比例为 10% (w/w), 会产生均匀的不溶产品, 具有最好的酶活性, 但是时间、温度和离子浓度效应需最适合于每一种酶 (Janson 等, 1971)。

4.5 固定化细胞

尽管需对许多方法进行改良才能适用于天然的细胞, 但是不论活细胞, 还是死细胞, 都可用类似于固定化酶的方法进行固定化。也可以采用 A 部分第 4 章相似的方法对这些方法进行分类 (Kennedy 和 Cabral, 1983)。

4.5.1 包埋

细胞在聚合物基质的空隙中包埋是采用的主要方法之一, 聚合物采用本书 A 部分和 B 部分所述的相同方法进行制备。使用的聚合物包括: 聚丙烯酰胺凝胶 (D'Souza 和 Nadkarni, 1980)、藻酸盐 (Paul 和 Vignais, 1980, Larreta Garde 等, 1979)、硅水凝胶 (Rouxhet 等, 1981) 和明胶 (Park 等, 1980)。更普遍使用的是多糖凝胶, 由于它们可在温和条件下形成。但是这些方法的使用有限, 这是由于最终制剂对分子较小的反应物和产物的细胞酶反应存在扩散限制。不过反应条件温和以及多糖基质的无毒稳定效应, 已形成了很稳定的固定化细胞系统, 这些系统可在中试实验工厂规模生产产品, 这在食品和制药工业上是很有潜力的 (例如异麦芽蔗糖 Cheetham 等, 1982)。

4.5.2 物理吸附

自然状态的所有微生物细胞是以吸附状态存在于土壤、

河流的淤泥以及附着于皮肤表面等,就是说会附着在任何它们接触到的表面上,并使表面具生物活性,这是微生物细胞的一种特性。某些类型微生物对附着到表面的柄的形成有利,而另一细胞的细胞壁上有粘膜或胶状物,这些东西具有吸附作用。用于固定化的材料有许多,包括有机物,如离子交换材料 (Hattori 和 Furusaka, 1961, Gainer 等, 1981)、聚乙烯氯 (Holló 等, 1980)、聚丙烯 (Holló 等, 1979)、煤 (Ngian 和 Martin, 1980); 木片 (Moo-Young 等, 1980) 和无机材料,如玻璃 (Rouxhet 等, 1981)、陶瓷 (Messing 等, 1979), 硅藻土 (Grindberys 等, 1977) 和不锈钢 (Atkinson 等, 1979)。

4.5.3 螯合或金属结合

已采用水合氧化钛 (IV) (Kennedy 等, 1980b) 和氢氧化锆 (Kennedy 等, 1976) 或者是水合氧化钛激活的纤维素 (Kennedy 等, 1980b) 固定化了许多种细胞, 并已用在中间试验厂规模的发酵罐中。此方法相当温和, 不会破坏细胞的生命过程, 此外还显示细胞已牢固地结合了。

4.5.4 共价结合

交联法, 尽管从性质讲条件温和, 但用于酶固定化的双功能试剂对许多细胞有毒, 所以它的应用受到严重限制。这种方法已用在催化单一反应的细胞中 (Chibata 等, 1974), 并使用戊二醛、重氮化二胺和甲苯二异氰酸盐, 这些化合物与细胞壁上的肽聚糖的自由氨基反应。交联和包埋已被用作戊二醛和藻酸盐或聚丙烯酰胺固定化结合的方法 (Ziomek 等, 1982)。

一个较温和、毒性较小的交联方法已得到发展, 这是建立在通过絮凝作用的物理交联, 使单位体积内有高浓度的细胞。

许多絮凝剂已被采用 (Lee 和 Long, 1974; Long, 1976), 包括阳离子多聚电解质, 如多胺类、聚乙烯胺和阳离子聚丙烯酰胺; 阴离子多聚电解质, 如羧基取代的聚丙烯酰胺、聚苯乙烯磺酸盐, 如氧化物、氢氧化物、镁(二价)、钙(二价)、铁(二价)和锰(二价)的硫酸盐和磷酸盐。

表 4.7 完整细胞共价结合的主要例子

支持物	偶联反应	参 考 文 献
羟烷基甲基丙烯酸 + 表氯醇二胺和戊二醛	形成希夫碱	Jirkú 等, 1980
氨基活化的硅石 + 戊二醛	形成希夫碱	Nararro 和 Durand, 1977
羧甲基纤维素 + 碳二亚胺	形成肽键	Jack 和 Zajic, 1977
乙烯/顺丁烯二酐共聚物	形成肽键	Shimizu 等, 1975
玻璃 + 聚异氰酸盐	形成肽键	Messing 和 Oppermann, 1979; Messing 等, 1979
氧化铝陶瓷 + 聚异氰酸盐	形成肽键	Messing 和 Oppermann, 1979; Messing 等, 1979
硅铬 + 甲苯异氰酸盐	形成肽键	Romanor-Skaya 等, 1980
纤维素 + 三过氮	烷基化	Gainer 等, 1981

4.6 其他固定化的生物活性分子

采用酶固定化发展起来的方法也可固定其他许多生物活性分子, 其产品可分为免疫吸附剂、亲和层析介质和固定化抗生素。

4.6.1 免疫吸附剂

通过一种类型的称为免疫吸附的柱层析, 主要是为了纯化抗原而制备固定化抗体。在这个过程中, 不纯抗原的溶液通过固定化抗体的床, 特定的抗原通过抗原-抗体相互作用被

吸附,溶液的其他部分从柱上洗下,再改变洗脱条件,可去掉抗原-抗体相互作用,得到纯抗原的洗脱液(Kennedy 等,1980c)。因此这种方法缩短了传统的漫长的层析技术的周期。当然,免疫吸附法也可以采用固定化抗原来纯化抗体,例如用对异型决定子结合力高的固定化抗体来分离免疫球蛋白的特异组分(Kennedy 等,1982),这就提供了研究极难表达的微量免疫球蛋白的异型成分。固定化抗体和抗原也可以在放射免疫测定技术中使用(Kennedy 和 Cho Tun, 1973a)。最常用于制备免疫吸附剂的方法是用溴化氰活化多糖(如琼脂糖和纤维素)的环化碳酸衍生物。

4.6.2 亲和层析介质

亲和层析是一种以物质与支持材料相互作用的强度不同为依据进行物质分离的技术,所用的支持材料是经修饰使之含有特异相互作用基团的。直接与本章相关的是生物相互作用而不是化学相互作用。被固定化以修饰固体支持物的分子可分为:凝集素、氨基酸和多肽类、碳水化合物、核苷类、核苷酸类和核酸。所有这些物质的使用方式,在本质上是相同的。使不纯材料的溶液与柱中的固定化物质接触或作为添加物加入溶液中。溶液和固相支持物分开,并经冲洗之后通过破坏专一性相互作用,使要纯化的分子从固相支持物上脱下来。

4.6.2.1 固定化凝集素

凝集素属于蛋白质类和糖蛋白类,这些糖蛋白对于一定的碳水化合物残基具有专一的亲和力,它可以是单糖或与其他单糖结合形成多糖或含碳水化合物的大分子,如糖蛋白。凝集素固定化已发展成一种从对特定的凝集素无亲和力的相似材料中分离和纯化碳水化合物的专一方法(Kennedy 和

White, 1983)。常用于凝集素固定化的支持物是聚碳水化合物,其中包括琼脂糖 (Kenntdy 和 Rose Vear, 1973)。许多固定化凝集素已商品化 (例如 Pharmacia 公司的 ConA-Sepharose 和 Miles 公司的 Glcaminosylex)。

4.6.2.2 固定化的氨基酸和肽类

除了某些固定化蛋白质 (即固定化酶) 具有催化特异性外, 在亲和层析中也采用固定化氨基酸和其聚合物 (肽和蛋白蛋)。固定化酶已用于亲和层析纯化它们的底物, 要求蛋白质可与底物结合但又不能与底物反应。然而, 反过来使用更为普遍, 即底物是固定化的, 并用来纯化酶。例如, L-赖氨酸固定在溴化氰活化的琼脂糖上, 用来纯化血纤维蛋白溶酶和血纤维蛋白溶酶原 (Burge 等, 1981)。也可以固定化对蛋白质起作用的抑制剂, 并用产物来纯化酶, 例如 Slaten 和 Strout (1981) 固定化合成的含 D-亮氨酸的八肽抑制剂以纯化血管紧张肽原酶。

4.6.2.3 固定化碳水化合物

单糖、寡糖和多糖形式的碳水化合物已用于: (a) 研究碳水化合物和它们的酶之间相互作用或者含碳水化合物大分子与其他化合物的作用。例如用固定化肝素研究蛋白酶与葡糖胺聚糖的相互作用 (Marossy, 1981), 或者肝素和凝血酶之间的相互作用 (Larsson 等, 1980); (b) 纯化碳水化合物定向的凝集素或酶。如用固定化乙-氨基 2-脱氧 D-葡萄糖来纯化酵母己糖激酶同工酶 (Kopetzki 和 Entian, 1982), 或用固定化淀粉 (Steup, 1981) 纯化 α -1, 4-D-葡聚糖磷酸化酶; (c) 制备固相底物以测定碳水化合物定向的酶。例如可用二环氧化物交联淀粉测定 α -淀粉酶作代表 (Ceska, 1972)。

4.6.2.4 固定化核苷、核苷酸和核酸

核酸及其成分的不溶衍生物已用于以下几方面。

(a) 通过碱基配对机理分离和纯化其他核酸、核苷酸等 (Lee 等, 1970);

(b) 通过碱基配对机理倍增单链核酸分子来进行合成 (Wagner 等, 1971);

(c) 以不溶底物形式用于亲和层析或估计核酸定向的酶, 如 DNA-糖基酶 (Thomas 等, 1982);

(d) 作为亲和层析材料, 用于纯化核酸结合蛋白质 (Trevillyan 和 Paul, 1982)。

5.6.3 固定化抗生素

抗生素的固定化可用许多种固相支持物来达到, 并且仍保留抗微生物活性, 其中包括聚 N-丙烯酰-4-和-5-氨基水杨酶 (Kennedy 等, 1973)、碳酸纤维素 (Kennedy 和 Cho Tun, 1973b)、水合金属氧化物 (Kennedy 和 Humphreys, 1976; Kennedy 等, 1981)。此方法提供了防止微生物侵蚀生物降解物质(包括固定化酶)的潜力, 并在医疗和工业上有利于缓慢释放有效成分。固定化抗生素还可用作亲和层析介质以纯化抗生素定向酶 (Coombe 和 Geoge, 1982) 和抗生素结合蛋白 (Tamura 等, 1980)。

第5章 酶在临床分析中的应用

——资料

B.J. 左尔德 B.F. 洛克斯

5.1 引言和感谢

这一章所收集的资料来自联合王国的制造和供应厂商所写的文献，这些厂商列于本章末表 5.5 中。其中许多厂商是国际上驰名的，它们的产品被广泛采用。然而，其中一些是小厂商，酶免疫测定法是最新的技术，这在 A 部分第 5 章中已作介绍。我们感谢所有这些厂商给我们提供了所需要的资料，其中不少厂商为查找我们所需要的资料，使我们常有最新的信息并克服了相当大的困难。Szabo 和 Örs(1983)制作了两个综合性表格，列出 (i) 在临床化学分析中用酶方法测量的底物；(ii) 最常用的酶免疫测定法 (EIA 方法)。他们的表格包括许多有关材料的文献，这些材料的试剂盒目前还没有普遍采用。

5.2 在临床化验室中用酶法测定底物

测定血液、血浆、血清和尿中的底物，有助于对许多疾病的诊断和监控。因此收集有关正常健康群体的资料作为对照是必不可少的。有关这些分析的更进一步的解释和用途的资料可以从一些专著中查找到 (Zilva 和 Pannall, 1979; Whitty, Percy-Robb 和 Smith, 1980)。

表 5.1 酶作为分析工具在底物测量中的应用

底物	反 应	终 点	试剂盒提 供者*
AMP	$\text{ADP} + \text{磷酸烯醇式丙酮酸} \xrightarrow[\text{激酶}]{\text{丙酮酸}} \text{ATP} + \text{丙酮酸}$	消耗 NADH, 测定 ADP, 5 然后加入肌酸激酶, 测定 AMP	
ADP	$\begin{aligned} \text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ &\xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\text{乳酸}} \text{L-乳酸} + \text{NAD}^+ \\ \text{AMP} + \text{ATP} &\xrightarrow[\text{肌激酶}]{} 2\text{ADP} \end{aligned}$		
ATP	$\begin{aligned} \text{ATP} + 3\text{-磷酸甘油酸} &\xrightarrow[\text{激酶}]{\text{磷酸甘油酸}} \text{ADP} + 1,3\text{-二磷酸甘油酸} \\ 1,3\text{-二磷酸甘油酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ &\xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\text{磷酸甘油酸}} 3\text{-磷酸甘油醛} + \text{Pi} + \text{NAD}^+ \end{aligned}$	消耗 NADH 5, 10, 22	
氨	$\alpha\text{-酮戊二酸} + \text{NH}_4^+ + \text{NAD(P)H} \xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\text{谷氨酸}} \text{L-谷氨酸} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O}$	通过酶法用 (TIM 和 GDH) 消除 3-磷酸甘油醛, 达到全部转变 在 340nm 处 NAD(P)H 减少 5, 7, 22	
α_1 -抗胰蛋白酶	$\begin{aligned} \text{胰蛋白酶} + \alpha_1\text{-抗胰蛋白酶} &\longrightarrow [\alpha_1\text{-抗胰蛋白酶} + \text{胰蛋白酶}] + \text{胰蛋白酶(残留)} \\ \text{N-苯甲酰精氨酸} &\xrightarrow[\text{胰蛋白酶(残留)}]{} \text{苯甲基精氨酸} + \text{对-硝基苯胺} \end{aligned}$	对-硝基苯胺生成 起始保温使部分胰蛋白酶失活 5	

表 5.1 (续)

底物	反 应	终 点	试剂盒提 供者*
2,3-二磷酸甘 油酸 (DPG)	$2,3\text{-二磷酸甘油酸} \xrightarrow{\text{磷酸酶}} 3\text{-磷酸甘油酸} + \text{P}_i$ $3\text{-磷酸甘油酸} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{激酶}} 1,3\text{-二磷酸甘油酸} + \text{ADP}$ $1,3\text{-二磷酸甘油酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{脱氢酶}} 3\text{-磷酸甘油醛} + \text{NAD}^+$	消耗 NADH	22
CO ₂	$\text{CO}_2 + \text{磷酸烯醇式丙酮酸} \xrightarrow{\text{羧化酶}} \text{磷酸烯醇式丙酮酸} \xrightarrow{\text{草酰乙酸} + \text{P}_i} \text{草酰乙酸} + \text{P}_i$	消耗 NADH	3, 7, 17
胆固醇	$\text{草酰乙酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{苹果酸脱氢酶}} \text{L-苹果酸} + \text{NAD}^+$ <p>(i) $\text{胆固醇} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{胆固醇酯酶}} \text{胆固醇} + \text{脂肪酸}$</p> $\text{胆固醇} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{胆固醇氧化酶}} \text{胆固醇-4-烯-3-酮} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{色原} \xrightarrow{\text{过氧(化)物酶}} \text{染料} + \text{H}_2\text{O}$ <p>(ii) $\text{胆固醇} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{胆固醇酯酶}} \text{胆固醇} + \text{脂肪酸}$</p> $\text{胆固醇} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{胆固醇氧化酶}} \text{胆固醇-4-烯-3-酮} + \text{H}_2\text{O}_2$	<p>跟踪染料形成</p> <p>如果胆固醇酯酶省去, 测定自由胆固醇</p> <p>在 410nm 处检测 3,5-二乙酰基-1, 4-二氢-2-甲基吡啶的形成</p>	<p>1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 16, 18, 20, 22</p> <p>5</p>

柠檬酸	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{甲醇} \xrightarrow{\text{过氧化氢酶}} \text{甲醛} + 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{甲醛} + 2\text{乙酰丙酮} + \text{NH}_3 \longrightarrow 3,5\text{-二乙酰-1,4-二氢二甲基吡啶} + 3\text{H}_2\text{O}$		
柠檬酸	$\text{柠檬酸} \xrightarrow{\text{柠檬酸裂解酶}} \text{草酰乙酸} + \text{乙醛}$ $\text{草酰乙酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{苹果酸脱氢酶}} \text{L-苹果酸} + \text{NAD}^+$ $\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\text{乳酸}} \text{L-乳酸} + \text{NAD}^+$	消耗 NADH 草酰乙酸自发地脱羧形成丙酮酸,因此需要第三个反应	5
肌酸酐	$\text{肌酸酐} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{肌酸酐酶}} \text{肌酸}$ $\text{肌酸} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{肌酸激酶}} \text{磷酸肌酸} + \text{ADP}$ $\text{ADP} + \text{磷酸烯醇式丙酮酸} \xrightarrow[\text{激酶}]{\text{丙酮酸}} \text{ATP} + \text{丙酮酸}$	消耗 NADH	
乙醇	$\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{乳酸脱氢酶}} \text{L-乳酸} + \text{NAD}^+$ $\text{乙醇} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{醇脱氢酶}} \text{乙醛} + \text{NADH} + \text{H}^+$	NADH 形成	5, 10, 22
尿中亚胺甲基-L-谷氨酸 (FIGLU)	$\text{FIGLU} + \text{四氢叶酸} \xrightarrow{\text{转移酶}} \text{亚胺甲基-四氢叶酸} + \text{谷氨酸}$ $\text{亚胺甲基-四氢叶酸} \xrightarrow[\text{环脱氨酶}]{\text{亚胺甲基-四氢叶酸}} \text{5,10-亚甲基四氢叶酸} + \text{NH}_4^+$	在 365nm 处吸收峰增加,原因是 5,10-亚甲基四氢叶酸生成	22

表 5.1(续)

底物	反 应	终 点	试剂盒 提供者*
半乳糖	(i) 半乳糖 $\xrightarrow{\text{半乳糖氧化酶}}$ 半乳糖酸内酯 + H_2O_2 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{色原} \xrightarrow{\text{过氧(化)物酶}} \text{染料} + \text{H}_2\text{O}$	染料形成	11
	(ii) 半乳糖 + NAD^+ $\xrightarrow{\text{半乳糖脱氢酶}}$ 半乳糖酸内酯 + $\text{NADH} + \text{H}^+$	NADH 形成	5
葡萄糖	(i) 葡萄糖 + $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{葡萄糖氧化酶}}$ 葡萄糖酸 + H_2O_2 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{色原} \xrightarrow{\text{过氧(化)物酶}}$ 染料 + H_2O	染料形成	5, 6, 7, 11, 14, 17, 18, 22
	(ii) 葡萄糖 + $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{葡萄糖氧化酶}}$ 葡萄糖酸 + H_2O_2	在氧电极使用氧 在过氧化物电极形成 H_2O_2	3
	(iii) 葡萄糖 + $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{葡萄糖氧化酶}}$ 葡萄糖酸 + H_2O_2		6
	(iv) 葡萄糖 + $\text{ATP} \xrightarrow{\text{己糖激酶}}$ 葡萄糖-6-磷酸 + ADP 葡萄糖-6-磷酸 + $\text{NAD(P)}^+ \xrightarrow{\text{脱氢酶}}$ 6-磷酸葡萄糖酸 + $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$	NAD(P)H 的形成	1, 3, 5, 7, 8, 10, 16, 19, 20, 22
	(v) 葡萄糖 + $\text{ATP} \xrightarrow{\text{己糖激酶}}$ 葡萄糖-6-磷酸 + ADP	跟踪 NADPH 形成	22

<p>(vi)</p> <p>葡萄糖-6-磷酸 $\xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\text{葡萄糖-6-磷酸} + \text{NADP}^+}$ $\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{叶枯净甲基硫酸酯(还原型)} \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{叶枯净甲基硫酸酯(还原型)}$ $\text{吩噻甲酯硫酸(还原型)} + \text{碘硝基四唑紫} \rightarrow \text{吩噻甲酯硫酸} + \text{碘硝基四唑紫(还原型)}$ $\beta\text{-D-葡萄糖} + \text{NAD}^+ \xrightarrow[\text{葡萄糖变旋酶}]{\text{葡萄糖脱氢酶和}} \text{D-葡萄糖内酯} + \text{NADH} + \text{H}^+$</p>	<p>由于甲酯产生</p> <p>在 340 nm 处跟踪 NADH 形成</p> <p>3,7,14</p>
<p>乳酸</p> <p>$\text{L-乳酸} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{乳酸脱氢酶}} \text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+$</p>	<p>在 340nm NADH 的形成。pH9-10 用肼能收集丙酮酸，或者用丙氨酸转氨酶，酶法除去丙酮酸</p> <p>5,10,17,22</p>
<p>磷脂酰胆碱 (卵磷脂)</p> <p>$\text{磷脂酰胆碱} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{磷脂酶C}} \text{甘油二酯} + \text{磷酸胆碱}$ $\text{磷酸胆碱} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{碱性磷酸酶}} \text{胆碱} + \text{磷酸}$ $\text{胆碱} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{胆碱激酶}} \text{磷酸胆碱} + \text{ADP}$ $\text{ADP} + \text{磷酸烯醇式丙酮酸} \xrightarrow{\text{丙酮酸激酶}} \text{丙酮酸} + \text{ATP}$ $\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{乳酸脱氢酶}} \text{L-乳酸} + \text{NAD}^+$</p>	<p>前两个反应完成后，通过煮沸停止反应，接着是第二阶段 340nm 处跟踪 NADH 的消耗</p> <p>5</p>

表 5.1(续)

底物	反 应	终 点	试剂盒 提供者*
α_2 -巨球蛋白	<p>胰蛋白酶 + α_1-巨球蛋白 \longrightarrow [α_2-巨球蛋白-胰蛋白酶] + 胰蛋白酶(残留的)</p> <p>胰蛋白酶(残留的) + aprotinin \longrightarrow 无活性的aprotinin-胰蛋白酶</p> <p>Z-缬氨酸-甘氨酸-精氨酸-对-硝基苯胺 + $\xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{[\alpha_2\text{-巨球蛋白-胰蛋白酶}]}$ Z-缬氨酸-甘氨酸-精氨酸-OH + 对-硝基苯胺。</p>	在抑制过量的胰蛋白酶后, 在 [α_2 -巨球蛋白-胰蛋白酶] 作用下产生对-硝基苯胺	5
丙酮酸	$\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\text{乳酸}} \text{L-乳酸} + \text{NAD}^+$	NADH 消耗, pH7 可以迫使平衡向乳酸形成的方向转移	4, 5, 10, 17, 22
甘油三酯	<p>(i) $\text{甘油三酯} + 3\text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{酯酶}]{\text{脂肪酶}} \text{甘油} + 3 \text{ 脂肪酸}$</p> <p>$\text{甘油} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{糖脂酶}]{\text{糖脂酶}} 3\text{-磷酸甘油} + \text{ADP}$</p> <p>$\text{ADP} + \text{磷酸烯醇式丙酮酸} \xrightarrow{\text{丙酮酸激酶}} \text{丙酮酸} + \text{ATP}$</p> <p>$\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{乳酸脱氢酶}} \text{L-乳酸} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$</p> <p>(ii) $\text{甘油三酯} + 3\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{脂肪酶/酯酶}} \text{甘油} + 3 \text{ 脂肪酸}$</p>	在 340nm 处跟踪, NADH 的消耗, 第一个皂化反应也可在乙醇 KOH 溶液中进行	1, 3, 5, 7, 10, 14, 19, 22
		NADH 形成与产生甲酯相连	3, 6, 7

尿素	甘油 + NAD ⁺ $\xrightarrow{\text{甘油脱氢酶}}$ 二羟丙酮 + NADH + H ⁺		
	四氮唑盐 + NADH $\xrightarrow{\text{心肌黄酶}}$ 甲臍 + NAD ⁺		
	(i) 尿素 + H ₂ O $\xrightarrow{\text{脲酶}}$ 2NH ₃ + CO ₂ (ii) 尿素 + 2H ₂ O $\xrightarrow{\text{脲酶}}$ 2NH ₄ ⁺ + HCO ₃ ⁻ α -酮戊二酸 + 2NADH + 2NH ₄ ⁺ $\xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\text{谷氨酸}}$ 2L-谷氨酸 + 2NAD ⁺ + 2H ₂ O	用苯酚次氨酸盐测量 NH ₃ 在 340nm 处, 消耗 NADH ₁₉ 20, 22	5, 8, 14, 17, 22 3, 5, 7, 10, 17, 18
尿酸	(i) 尿酸 + 2H ₂ O + O ₂ $\xrightarrow{\text{尿酸酶}}$ 尿囊素 + CO ₂ + H ₂ O ₂		在 293nm 处测量尿酸的减少 生成 NADH
	(ii) 尿酸 + 2H ₂ O + O ₂ $\xrightarrow{\text{尿酸酶}}$ 尿囊素 + CO ₂ + H ₂ O ₂ H ₂ O ₂ + C ₂ H ₅ OH $\xrightarrow{\text{过氧化氢酶}}$ CH ₃ CHO + 2H ₂ O CH ₃ CHO + NADP ⁺ $\xrightarrow{\text{醛脱氢酶}}$ 乙酸 + NADPH + H ⁺		5, 14
	(iii) 尿酸 + 2H ₂ O + O ₂ $\xrightarrow{\text{尿酸酶}}$ 尿囊素 + CO ₂ + H ₂ O ₂ 2H ₂ O + 色原 $\xrightarrow{\text{过氧(化)物酶}}$ 染料 + 4H ₂ O	染料形成	3, 4, 5, 6, 7, 18

* 试剂盒供应厂商名和地址见表 5.5。

表 5.1 是用酶作为临床化验室的一种分析工具分析底物,表中只列出预先包装成试剂盒的底物。氨、 α_1 -抗胰蛋白酶、乙醇、半乳糖、葡萄糖(vi)、乳酸、 α_2 -巨球蛋白、丙酮酸、尿素(i)和尿酸(i)可用单酶系统。其他底物也包括半乳糖、葡萄糖、尿素和尿酸,可用两个以上的酶系统,最通用的终点是 NAD^+ 和 NADH 之间的转化。葡萄糖(v)和甘油三酯(ii)通过形成甲臆来测量 NADH , 而用 A 部分(5.2.4.2)中所讨论的方法测定 O_2 或 H_2O_2 , 对于胆固醇、葡萄糖和尿酸的测定也很重要。 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 之间的转化已用于氨和葡萄糖(iv)的测量。只有 α_1 -抗胰蛋白酶亚胺甲基-L-谷氨酸(FIG LU)、 α_2 -巨球蛋白、尿素(i)和尿酸(i)的测定有不同的终点。显而易见,胆固醇、半乳糖、葡萄糖、甘油三酯、尿素和尿酸不止一种酶测定方法。葡萄糖(vi)、乳酸、甘油三酯(i)、尿素(ii)和尿酸(ii)可用酶动力学方法进行测定。表 5.1 列举的大部分底物也可用没有酶介入的其他分析方法测定。

ADP 和 AMP 在同一样品中进行测定。ADP 可利用 NADH 的偶联系统测定,只有在这个反应完成后才加入第二种酶,即肌激酶。AMP 向 ADP 转化,使 AMP 得以测定。所使用的酶是前面提到的测定 ADP 所用的同样的酶。

表 5.1 中包括两种蛋白质。 α_1 -抗胰蛋白酶是在预先用胰蛋白酶保温之后进行测定的。只有未被抑制的胰蛋白酶参加反应(Zazgornik 等, 1980)。 α_2 -巨球蛋白也和胰蛋白酶结合,但此时形成的复合物是有活性的。因此首先让过量的胰蛋白酶与 aprotinin 发生反应,然后再测定 α_2 -巨球蛋白-胰蛋白酶复合物的活性。

使用酶法分析的最常见底物是尿素、葡萄糖、胆固醇、甘油三酯和尿酸。动力学方法适用于所有这些底物。

供应厂商对每一种测试都附有使用说明书,这些说明书

描写测试原理并附有文献, 特别应注意可使用的样品及预处理, 有时可能需要沉淀蛋白质, 还应注意到试剂的组成和稳定性。对实验过程与实验结果校准和计算的方法也应有详细描述。此外, 对常见的干扰物质要加以注意。虽说已提到使用范围, 每个化验室也应定出正常使用范围。对实验结果应有进行解释的指南, 但这是临床医生的职责。

5.3 在临床化验室中用偶联酶系统测定酶

收集在表 5.2 中的资料列出了利用偶联酶对其他酶进行测定的市售试剂盒。为了达到 NAD^+/NADH 的终点只有两种测定需要一种以上偶联酶, 它们是肌酸激酶和 α -淀粉酶 (i)。只有 α -淀粉酶 (ii) 的测定不使用这个终点, 因为接着产生黄色对-硝基苯酚 (Wallenfels 等, 1978)。

在苹果酸脱氢酶测定中, 采用一种不常用的偶联系统。在这种情况下, 第一种酶天冬氨酸氨基转移酶用来产生草酰乙酸, 而草酰乙酸作为第二个反应苹果酸脱氢酶的底物。原因是草酰乙酸不稳定, 易于脱羧形成丙酮酸。

在表 5.2 所列出的酶中, 测定其中一种酶的目的是用来查明在儿童中此酶是否缺失或不足。这种酶是半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶, 在半乳糖全部转化成葡萄糖中需要此酶。通过不连续测定测出此酶在红细胞中的量。制备好的溶血液和半乳糖-1-磷酸一起保温 15 分钟, 然后停止反应, 紧接着通过产生 NADH 的第二个反应测定 UDPG 存留量。在原反应混合物中 UDPG 的量是在另一试管中被测定, 此试管中省去半乳糖-1-磷酸。正常人的血液几乎能够消耗所有的 UDPG 。相反, 半乳糖血症儿童的血液几乎不能利用这种化合物。

表 5.2 以酶作为测定其他酶的分析工具

酶	反	应	终 点	试剂盒提 供者*
丙氨酸氨基转 移酶	L-丙氨酸 + α -酮戊二酸 $\xrightarrow{\text{丙氨酸氨基转移酶}}$ 丙酮酸 + NADH + H^+ 果糖 1,6-二磷酸 $\xrightarrow{\text{醛缩酶}}$ 甘油醛-3-三磷酸 $\xrightarrow{\text{磷酸丙糖异构酶}}$ 2-磷酸二羟丙酮 $\xrightarrow{\text{甘油-1-磷酸脱氢酶}}$ 2-甘油-1-磷酸 + $2NAD^+ + 2NADH + 2H^+$	丙酮酸 + L-谷氨酸 $\xrightarrow{\text{乳酸脱氢酶}}$ L-乳酸 + NAD $^+$	跟踪 NADH 消耗	1,3,4,5,7,8, 10,14, 16,17,19,20, 22
醛缩酶	果糖 1,6-二磷酸 $\xrightarrow{\text{醛缩酶}}$ 甘油醛-3-三磷酸 $\xrightarrow{\text{磷酸丙糖异构酶}}$ 2-磷酸二羟丙酮 $\xrightarrow{\text{甘油-1-磷酸脱氢酶}}$ 2-甘油-1-磷酸 + $2NAD^+ + 2NADH + 2H^+$	3-磷酸甘油醛 + 磷酸二羟丙酮 $\xrightarrow{\text{磷酸丙糖异构酶}}$ 磷酸二羟丙酮 $\xrightarrow{\text{甘油-1-磷酸脱氢酶}}$ 2-甘油-1-磷酸 + $2NAD^+ + 2NADH + 2H^+$	跟踪 NADH 消耗	5,10
α -淀粉酶	(i) 麦芽庚糖 + H_2O $\xrightarrow{\alpha\text{-淀粉酶}}$ 麦芽三糖 + 2 H_2O $\xrightarrow{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}}$ 3葡萄糖糖 + 3ATP $\xrightarrow{\text{己糖激酶}}$ 3葡萄糖-6-磷酸 + $3NAD^+$ $\xrightarrow{\text{葡萄糖-6-磷酸脱氢酶}}$ 3NADH + $3H^+$ (ii) 对硝基酚麦芽戊糖苷 $\xrightarrow{\alpha\text{-淀粉酶}}$ 对-硝基酚麦芽糖苷 + 麦芽三糖	麦芽三糖 + 麦芽四糖 $\xrightarrow{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}}$ 3葡萄糖 3葡萄糖-6-磷酸 + $3ADP$ 3葡萄糖-6-磷酸 $\xrightarrow{\text{葡萄糖-6-磷酸脱氢酶}}$ 3NADH + $3H^+$ 对-硝基酚麦芽糖苷 + 麦芽三糖	NADH 形成	3,5 10

(iii)	<p>对-硝基酚麦芽糖苷 $\xrightarrow{\alpha\text{-葡萄糖苷酶}}$ 对-硝基酚 + 2葡萄糖</p> <p>麦芽四糖 + H₂O $\xrightarrow{\alpha\text{-淀粉酶}}$ 2 麦芽糖</p> <p>麦芽糖 + 磷酸 $\xrightarrow{\text{麦芽糖磷酸化酶}}$ 葡萄糖 + 葡萄糖-1-磷酸</p> <p>葡萄糖-1-磷酸 $\xrightarrow{\text{磷酸葡萄糖变位酶}}$ 葡萄糖-6-磷酸</p> <p>葡萄糖-6-磷酸 + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{葡萄糖-6-磷酸脱氢酶}}$ 6-磷酸葡萄糖酸 + NADH + H⁺</p>	跟踪 NADH 形成	
天冬氨酸氨基转移酶	<p>L-天冬氨酸 + α-酮戊二酸 $\xrightarrow{\text{天冬氨酸氨基转移酶}}$ 草酰乙酸 + L-谷氨酸</p> <p>草酰乙酸 + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{苹果酸脱氢酶}}$ L-苹果酸 + NAD⁺</p> <p>(在一些测定中乳酸脱氢酶也被额外加入以在酶测定开始前消除内源丙酮酸)</p>	跟踪 NADH 消耗	1,3,4,5,7,8,10,14,16,17,19,20,22
肌酸磷酸激酶 (和同工酶)	<p>磷酸肌酸 + ADP $\xrightarrow{\text{肌酸激酶}}$ 肌酸 + ATP</p> <p>ATP + 葡萄糖 $\xrightarrow{\text{己糖激酶}}$ 葡萄糖-6-磷酸 + ADP</p>	跟踪 NADPH 形成	1,3,5,6,7,8,10,14,18,19,20,22

表 5.2 (续)

酶	反 应	终 点	试剂盒 提供者*
	$\text{葡萄糖-6-磷酸} + \text{NADP}^+ \xrightarrow[\text{脱氢酶}]{\text{葡萄糖-6-磷酸}} 6\text{-磷酸葡萄糖} + \text{NADPH} + \text{H}^+$		
半乳糖-1-磷酸 尿苷转移酶	$\text{半乳糖-1-磷酸} + \text{UDPG} \xrightarrow[\text{尿苷转移酶}]{\text{半乳糖-1-磷酸}} \text{葡萄糖-1-磷酸} + \text{UDP-半乳糖}$ $\text{UDPG} + 2\text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{UDP-葡萄糖脱氢酶}} \text{UDP-葡萄糖} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$	测定在存在和不足半乳糖-1-磷酸情况下使用的NADH的不同	22
脂肪酶	$\text{H}_2\text{O} + \text{乙稀基-8-苯基辛酸} \xrightarrow{\text{脂肪酶}} 8\text{-苯基辛酸} + \text{乙醛}$ $\text{乙醛} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{醇脱氢酶}} \text{乙醇} + \text{NAD}^+$	跟踪 NADH 消耗	10
苹果酸脱氢酶	$\text{L-天冬氨酸} + \alpha\text{-酮戊二酸} \xrightarrow{\text{天冬氨酸转氨酶}} \text{L-谷氨酸} + \text{草酰乙酸}$ $\text{草酰乙酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{苹果酸脱氢酶}} \text{L-苹果酸} + \text{NAD}^+$	跟踪 NADH 消耗	5
5'-核苷酸酶	$\text{AMP} \xrightarrow{5'\text{-核苷酸酶}} \text{腺苷} + \text{Pi}$	跟踪 NADH 的消耗	22

	腺苷 $\xrightarrow{\text{腺苷脱氢酶}}$ 次黄苷 + NH_4^+		
	$\text{NH}_4^+ + \alpha\text{-酮戊二酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{谷氨酸脱氢酶}} \text{L-谷氨酸} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$		
磷酸己糖异构酶	果糖-6-磷酸 $\xrightarrow{\text{磷酸己糖异构酶}}$ 葡萄糖-6-磷酸 葡萄糖-6-磷酸 + NADP^+ $\xrightarrow{\text{葡萄糖-6-磷酸脱氢酶}}$ 6-磷酸葡萄糖酸 + $\text{NADPH} + \text{H}^+$	跟踪 NADPH 形成	22
丙酮酸激酶	磷酸烯醇式丙酮酸 + $\text{ADP} \xrightarrow{\text{丙酮酸激酶}}$ 丙酮酸 + ATP	跟踪 NADH 的消耗	5
	丙酮酸 + $\text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{乳酸脱氢酶}}$ L-乳酸 + NAD^+		

* 试剂盒供应厂商名和地址见表 5.5。

表 5.3 使用固定化酶的市售诊断产品

底物	固定化酶	试剂盒提供者***
(a) 附在线圈上的酶		
肌酸酐	肌酸酐酶	9
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	2,9
葡萄糖	己糖激酶/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	24
尿素	脲酶	2,9
尿酸	尿酸酶	9,24
(b) 生物分析探针		
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	6
(c) 干试剂条		
胆固醇*	胆固醇氧化酶/胆固醇酯酶/过氧(化)物酶	2
葡萄糖*	葡萄糖氧化酶/过氧(化)物酶	2,5
甘油三酯**	脂肪酶/甘油激酶/ α -磷酸甘油脱氢酶/ 心肌黄酶	2
尿酸	尿酸酶/过氧(化)物酶	2
(d) 多层片基		
胆固醇**	胆固醇酯水解酶/胆固醇氧化酶/过氧(化)物酶	12
肌酸酐	肌酸酐亚胺水解酶	12
葡萄糖	葡萄糖氧化酶/过氧(化)物酶	12
甘油三酯**	脂肪酶/甘油激酶/L- α -磷酸甘油氧化酶/ 过氧(化)物酶	12
尿素	脲酶	12
尿酸	尿酸酶/过氧(化)物酶	12

* 用血糖试纸条的反射比色计可由数家厂商购得,包括 2.5。

** 在编写胆固醇和甘油三酯测定法时,并无商品出售,但已处于开发最后阶段并正在作鉴定。

*** 试剂盒供应厂商名和地址见表 5.5。

在血清或血浆测定中,表 5.2 中列出的其他酶用来检验特定组织的损伤。最常测定的酶是丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶和肌酸激酶。对这些酶和在表 5.2 中列举的其他多数不采用偶联酶系统的酶,可用其他方法进行测定。

5.4 用固定化酶测定底物

各种类型的固定化酶系统列于表 5.3。一般来讲,所涉及的化学反应列于表 5.1 中。在临床分析中酶应用的特殊范围,由生产这种固定化酶试剂的厂来控制。一些关于酶附着于线圈和生物分析探针的早期工作先于商业机构介入之前。但是一旦对这种形式的酶的潜在应用付出评价,就意味着需要相当的资金投资,这不仅仅是为了生产适合的固定化酶,而且也是为了发展全套技术,一般包括对定量所必需的仪器设备。从表 5.3 中可以明显看出这些厂商专营哪些领域。

表 5.4 常用于酶免疫测定法的酶

酶	来源	终 点	试剂盒提供者*
(a) 非均相的测定			
碱性磷酸酶	小牛小肠	从对-硝基苯磷酸生成对-硝基酚	10,15,25,26
β -D-半乳糖苷酶	大肠杆菌	从相应的 β -半乳糖苷底物生成邻-硝基酚或 4-甲基伞形酮	25
过氧(化)物酶	辣根	H_2O_2 /色原	1,5,7,10,13,17,21,25
脲酶	刀豆	NH_3 /色原	21
(b) 均相测定			
乙酰胆碱酯酶	电气鳗类	比色法	1
β -D-半乳糖苷酶 葡萄糖-6-磷酸	大肠杆菌	生成带萤光的 4-甲基伞形酮	15
脱氢酶	肠明串珠菌	NADH 形成	23
溶菌酶	鸡蛋白	形成藤黄微球菌细胞壁的片段	23
苹果酸脱氢酶	猪心线粒体	NADH 的形成	23

* 试剂盒供应厂商名和地址见表 5.5。

5.5 酶用于酶免疫测定法 (EIA)

一般来说,非均相 ETA 和均相 EIA 用的酶是不同的(表 5.4),常用于非均相测定的酶有高转换数并形成有颜色的产品。当只需要定性的结果时,这种方法特别有用,例如用于筛选传染病。然而利用这些酶进行非常专一的灵敏的定量测定也是有可能的。如果需要提高灵敏度,用碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶进行荧光测定也是可能的。

在均相 EIA 中,可以进行连续测定。最常用的酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶,两者可以很容易地通过监测 340nm 处的吸收增加来测定。如果需要很高的灵敏度时,这种变化也可以用荧光法监测。使用 β -半乳糖苷酶的市售测定系统,没有其他类型 EIA 那样的放大作用,在这种情况下,必须采用荧光测定法来达到所需要的灵敏度。

表 5.5 英国的试剂盒供应厂商和仪器制造厂商的名字和地址
(表中的文献号与表 5.1、5.2、5.3、5.4 的文献号相同,大部分公司
在其他国家设有代办处)

公司名	地址和电话号码	文献号
Abbott Laboratories Ltd, Diagnostics Division	Brighton Hill Parade, Basingstoke, Hampshire RG22 4EH 0256-54051	1
Ames Division Miles Laboratories Ltd.	P.O. Box 37, Stoke Court, Stoke Poges, Buckinghamshire, SL2 4LY 028-14-2151	2
Beckman-RHC Ltd, Analytical Instruments Sales and Service Operation	Progress Road, Sands Industrial Estate, High Wycombe, Buckinghamshire, HP12 4JL 0494-41181	3
BDH Chemicals Ltd	Poole, Dorset, BH12 4NN 0202-745020	4
BCL, Boehringer Corporation (London) Ltd.	Bell Lane, Lewes, East Sussex, BN7 1LG 07916-71611	5
Clandon Scientific Ltd	Lysons Avenue, Ash Vale, Aldershot, Hampshire GU12 5QR 0252-514711-5	6
Corning Medical and Scientific Corning Ltd.	Halstead, Essex, CO9 2DX 0787-472461	7
Diamed Diagnostics Ltd	Mast House, Derby Road, Bootle, Merseyside, L20 1EA 051-933-7277	8
Erba Science (UK) Ltd	14 Bath Road, Swindon, SN1 4BA 0793-33551	9
Hoechst UK Ltd Pharmaceutical Division	Hoechst House, Salisbury Road, Hounslow, Middlesex, TW4 6JH 01-570-7712	10
Hughes & Hughes Ltd	Elms Industrial Estate, Church Road, Harold Wood, 11 Romford, Essex, RM3 0HR 040-23-49017	

表 5.5(续)

公司名	地址和电话号码	文献号
Kodak Ltd	Station Road, Hemel Hempstead, Hertfordshire, HP1 1JU 0442-61122	12
Kone Instruments	Regent House, Heaton Lane, Stockport, Cheshire, SK4 1BS 061-477-0662	13
Merk	169 Oldfield Lane, Greenford, Middlesex, UB6 8PN	14
EM Diagnostics	01-575-5228	
Miles Laboratories Ltd.	P.O. Box 37, Stoke Court, Stoke Poges, Slough, SL2 4LY 02814-5151	15
Monitor International	Robell Way, Storrington, Pulborough, West Sussex RH20 3DW 090-66-5311	16
Norris Biomedical Ltd	P.O. Box 25, Basingstoke, Hampshire (0)256-881877	17
Pierce & Warriner (UK) Ltd	44 Upper Northgate Street, Chester, CH1 4EF 0244-382525	18
Roche Products Ltd Diagnostics Division	P.O. Box 8, Welwyn Garden City, Hertfordshire, AL7 3AY 07073-28128	19
Ross Lab. G. S. Ross Ltd.	Unit 13, Fence Avenue Industrial Estate, Macclesfield, Cheshire, SK11 1LT 0625-610077	20
Sera-Lab Ltd	Crawley Down, Sussex, RH10 4FF 0342-716366	21
Sigma London Chemical Co. Ltd	Fancy Road, Poole, Dorset, BH17 7NH 0202-733114	22
Syva UK	Syntex House, St Ives Road, Maidenhead, Berkshire, SL6 1RD 0628-70969	23
Technicon Instruments Co. Ltd	Evans House, Hamilton Close, Basingstoke, Hampshire, RG21 2YE 0256-29181	24
Townson & Mercer Ltd	93-96 Chadwick Road, Astmoor, Runcorn, Cheshire WA7 1PR 09285-76245	25
Don Whitley Scientific Ltd	Green Lane, Baildon, Shipley, West Yorkshire BD17 5JS 0274-595728	

参 考 文 献

A 部分 第2章

- Ackers, G. K. (1970) *Adv. in Protein Chemistry* 23 343-446.
- Amarant, T., Fridkin, M., & Koch, Y. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127 647-650.
- Anderson, T. F. (1949) *Bot. Rev.* 15 464-505.
- Andrews, P. (1970) *Meth. Biochem. Anal.* 18, 1-53.
- Atkinson, A. (1973) *Process Biochem.* 8 9-13.
- Atkinson, A., Bradford, P. A. & Selmes, I. P. (1973) *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 23 517-529.
- Atkinson, A. & Jack, G. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 308 41-52.
- Atkinson, A., Phillips, B. W., Callow, D. S., Stones, W. R. & Bradford, P. A. (1972) *Biochem. J.* 127 63-64.
- Atkinson, A., Banks, G. T., Bruton, C. J., Comer, M. J., Jakes, R., Kamalagharon, T., Whitaker, A. R. & Winter, G. (1979) *J. Appl. Biochem.* 1 247-258.
- Atkinson, A., McArdell, J. E., Scawen, M. D., Sherwood, R. F., Small, D. A. P., Lowe, C. R. & Bruton, C. J. (1982) In *Affinity Chromatography and Related Techniques*, pp. 399-410. Ed. by T. C. J. Gribnau, J. Visser and R. F. J. Nivard. Elsevier, Amsterdam.
- Axen, R., Porath, J. & Ernback, S. (1967) *Nature* 214 1302-1304.
- Baydoun, H., Hoppe, J., Freist, W. & Wagner, K. G. (1982) *J. Biol. Chem.* 257 1032-1036.
- Bechold, H. (1907) *Kolloid Z.* 2 3 and 33.
- Bergmann, L. & Hatfield, H. S. (1938) *Ultrasonics* Wiley, New York.
- Bernardi, G. (1971) *Methods Enzymol.* 22 325-339.
- Bernardi, G. and Kawasaki, T. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 160, 301-310.
- Bernardi, G., Giro, M. G. & Gaillard, C. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 278 409-420.
- Bethel, G. S., Ayres, J. S., Hearn, M. T. W. & Hancock, W. S. (1981) *J. Chromatogr.* 219 353-359.
- Bingham, A. H. A., Sharman, a. F. & Atkinson, A. (1977) *FEBS Lett.* 2 250-256.
- Blatt, W. F., Feinberg, M. P., Hoppenberg, H. B. & Saravis, C. A. (1965) *Science* 150 224-225.
- Bloemendal, H. & Groenwoud, G. (1981) *Anal. Biochem.* 117 327-329.
- Booth, B. H. & Green, D. E. (1938) *Biochem. J.* 32 855-861.
- Bosco, G. (1956) *J. Inf. Dis.* 99 270-274.
- Brewer, J. (1971) *Process Biochem.* 6 39-42.
- Brewer, S. J., Berkeley, R. C. W. & Melling, J. (1973) *Biochem. Soc. Trans.* 1 1093-1095.
- Brummelhuis, H. G. J. & Krijnen, H. W. (1970) in *Inter. Symp. on Anti-Lymp. Serum. Versailles Symp. Series Immuno. Biol. Standard* vol. 16, pp. 145-152 Karger.
- Bruton, C. J., Jakes, R. & Atkinson, A. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59 327-333.
- Buchner, E. & Hahn, H. (1903) *Die Zymase Garung*. Oldenburg, Munich.
- Bucke, C. (1983) in *Principles of Biotechnology* pp. 151-170. (Ed. by A. Wiseman), Surrey University Press.
- Buckland, B. C., Richmond, W., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1974) In *Industrial Aspects of Biochemistry* FEBS vol. 30, pp. 65-79; Ed. by B. Spencer. North Holland Publishing Co., Amsterdam and London.
- Burgess, R. R. (1969) *J. Biol. Chem.* 244 6160-6167.
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. & Baurz, E. K. F. (1969) *Nature* 221 43-46.
- Cedar, H. & Schwartz, J. H. (1967) *J. Biol. Chem.* 242 3753-3755.
- Charm, S. E. & Matteo, C. C. (1971) *Methods Enzymol.* 22 476-556.
- Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L., Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Metin, M. & Taylor, H. L. (1946) *J. Am. Chem. Soc.* 68 459-475.
- Cowman, S. E. & Speck, M. L. (1969) *Cryobiology* 5 291-299.
- Curran, H. R. & Evans, F. R. (1942) *J. Bacteriol.* 43 125-138.
- Darbyshire, J. (1981) In *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. Vol. 5, pp. 147-186 Ed. by A. Wiseman. Ellis Horwood.
- Davidson, J. N. (1965) In *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 5th Ed. Methuen & Co. Ltd.
- Davidson, P. F. (1959) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 45 1560-1568.
- Davies, R. B., Abraham, E. P. & Melling, J. (1974) *Biochem. J.* 143 115-127.
- Dean, P. D. G. & Watson, D. H. (1979) *J. Chromatogr.* 165 301-319.
- Determann, H. (1964) *Angew. Chem.* 76 635-644.

- Dixon, M. & Webb, E. C. (1961) *Adv. in Protein Chem.* **16** 197-219.
- Dixon, M. & Webb, E. C. (1979) in *Enzymes*, Longmans, London.
- Dizdaroğlu, M., Krutzsch, H. C. & Simic, M. G. (1982) *Anal. Biochem.* **123** 192-193.
- Dinovick, R., Bayan, A. P., Canales, P. & Pansy, J. (1948) *J. Bacteriol.* **56** 125-137.
- Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1972) *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 3, p. 103.
- Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1972) in *Enzyme Engineering*, pp. 101-113.
- Eaton, N. R. (1962) *J. Bacteriol.* **83** 1359-1360.
- Edebo, L. (1969) in *Fermentation Advances*, pp. 249-271. Ed. by D. Perlman. Academic Press, New York.
- Edwards, C. D. & Noller, E. C. (1964) *Proc. Okla. Acad. Sci. U.S.A.* **44** 196-200.
- Elsworth, R., Meaking, L. R. P., Pirt, S. J. & Capell, G. H. (1956) *J. Appl. Bact.* **19** 264-278.
- Er-el, Z., Zaidenzaig, Y. & Shaltiel, S. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49** 383-390.
- Fasold, H., Gundlach, H. G. & Turba, F. (1961) In *Chromatography*, p. 406. Ed. by E. Heftman. Reinhold, New York.
- Fleetwood, J. G. & Milne, G. R. (1967) *Protides of Biol. Fluids* **15** 545-550.
- Follows, M., Hetherington, P. J., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1971) *Biotechnol. Bioeng.* **XIII** 549-560.
- Foster, P. & Watt, J. G. (1980) In *Methods of Plasma Protein Fractionation*, pp. 17-31. Ed. by J. M. Curling. Academic Press.
- Fraser, D. (1951) *Nature* **167** 33-34.
- Frey, M. D. and Radola, B. J. (1982) *Electrophor.* **3** 216-
- Gierer, A. (1957) *Nature* **179** 1297-1299.
- Gorill, R. H. & McNeil, E. M. (1960) *J. Gen. Microbiol.* **22** 437-442.
- Gospodarnadez, D., Ge-Mung Lut & Cheng, J. (1982) *J. Biol. Chem.* **257** 12266-12276.
- Grassman, W. & Hannig, K. (1949) *DBP505399* May 24th.
- Gray, G. W. & Wilkinson, S. G. (1965) *J. Gen. Microbiol.* **39** 385-399.
- Green, A. A. & Hughes, W. L. (1955) *Methods Enzymol.* **1** 72-90.
- Guerritore, D. & Bellelli, L. (1969) *Nature* **184** 1638.
- Gunsalus-Miguel, A., Meighen, E. A., Nicoli, M. S. & Neelson, K. H. (1972) *J. Biol. Chem.* **247** 398-404.
- Gurfreund, H. (1943) *Biochem. J.* **37** 186-188.
- Haas, M. J. & Dowding, J. E. (1975) *Methods Enzymol.* **43** 611-628.
- Hagen Per-Otto (1971) In *Inhibition and Destruction of the Microbiol. Cell*, pp. 39-70. Ed. by W. B. Hugo. Academic Press, London.
- Haller, W. (1968) *J. Chromatog.* **32** 676-684.
- Hammond, P. M., Price, C. P. & Scawen, M. D. (1983) *Eur. J. Biochem.* **132** 651-655.
- Hanafusa, N. (1969) In *Freezing and Drying of Microorganisms*, pp. 117-129. Ed. by T. Nei. University of Tokio Press, Tokio.
- Hancock, W. S. & Sparrow, J. T. (1983) In *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, vol. 3, pp. 50-87. Ed. by C. Horvath. Academic Press, London and New York.
- Hao, Y. L., Ingham, K. C. & Wickerhauser, M. (1980) In *Methods of Plasma Protein Fractionation*, pp. 57-74. Ed. by J. M. Curling. Academic Press, London and New York.
- Harden, A. (1923) *Alcoholic Fermentation*. Longmans, Green and Co., London.
- Hearn, M. T. W. (1982) In *Advances in Chromatography*, vol. 20, pp. 2-82. Ed. by J. C. Giddings. Marcel Dekker, New York and Basel.
- Hellman, K., Miller, D. S. & Cammack, K. A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **749**, 133-142.
- Heppel, L. (1955) *Methods Enzymol.* **1** 137-138.
- Heppel, L. A. (1967) *Science* **156** 1451-1455.
- Heppel, L. A. (1969) *J. Gen. Physiol.* **54** 955.
- Hjelmeland, L. M. & Chrambach, A. (1981) *Electrophor.* **2** 1-.
- Hjelmeland, L. M. & Chrambach, A. (1982) *Electrophor.* **3** 9-.
- Hjerten, S. & Mosbach, R. (1962) *Anal. Biochem.* **3** 109-118.
- Hjerten, S., Rosengren, J. & Pahlman, S. (1974) *J. Chromatogr.* **101**, 281-.
- Hughes, D. E. (1951) *Brit. J. Exptl. Path.* **32** 97-109.
- Hughes, D. E. (1962) *J. Gen. Microbiol.* **29** 39-46.
- Hughes, D. E., Wimpenny, J. W. T. & Lloyd, D. (1971) In *Methods in Microbiology*, vol. **5B**, pp. 1-54. Ed. by J. R. Norris and D. W. Ribbons. Academic Press, London and New York.
- Hughes, W. L. (1954) In *The Proteins 2*, Part B. Ed. by H. Neurath and K. Bailey. Academic Press, London.
- Hugo, W. B. (1954) *Bacteriol. Revs.* **18** 87-105.

- Hunt, A. L., Rodgers, A. & Hughes, D. E. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 34 354-372.
- Hustedt, H., Kroner, K. H., Stach, W. & Kula, M.-R. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* 20 1989-2005.
- Ikawa, M. & Snell, E. E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235 1376-1382.
- Janson, J. C. & Hedman, P. (1982) *Adv. Biochem. Eng.* 25 43-99.
- Jones, A. S. (1953) *Biochim. Biophys. Acta* 10 607-612.
- Kawasaki, T. (1970a) *Biopolymers* 9 277-289.
- Kawasaki, T. (1970b) *Biopolymers* 9 291-306.
- Kawasaki, T. & Bernardi, G. (1970a) *Biopolymers* 9 257-268.
- Kawasaki, T. & Bernardi, G. (1970b) *Biopolymers* 9 269-276.
- King, H. K. & Alexander, H. (1948) *J. Gen. Microbiol.* 2 315-324.
- Klevens, H. B. (1950) *Chem. Revs.* 47 1-74.
- Kohn, J. & Wilchek, M. (1981) *Anal. Biochem.* 15 375-382.
- Kohn, J. & Wilchek, M. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* 4 161-163.
- Kopperschlager, G. & Johansson, G. (1982) *Anal. Biochem.* 124 117-124.
- Kopperschlager, G., Bohme, H. J. & Hofman, E. (1982) *Adv. Biochem. Eng.* 25 101-138.
- Kopetzki, E. & Entian, K.-D. (1982) *Anal. Biochem.* 121 181-185.
- Kroner, K. H., Hustedt, H., Granda, S. & Kula, M. R. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* 20 1967-1988.
- Kroner, K. H., Hustedt, H. & Kula, M. R. (1982) *Biotechnol. Bioeng.* 24 1015-1045.
- Kula, M. R. (1979) In *Applied Biochemistry and Bioengineering*. Ed. by L. B. Vingard, E. Katzir-Katchalski, E. & L. Goldstein. Vol. 2, Academic Press, London and New York.
- Kula, M. R., Honig, W. & Foellmer, H. (1977) In *Proceedings of International Workshop on Technology for protein Separation and Improvement of Blood Plasmid Fractionation*. pp. 361-371. Ed. by H. E. Sandberg. National Institutes of Health Publication No. 78-1422, Washington D.C.
- Kuwabara, S. (1970) *Biochem. J.* 118 457-465.
- Largier, J. F. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 21 433-438.
- Largier, J. F. (1957) *J. Immunol.* 79 181-186.
- Larsson, P. O., Glad, M., Hansson, L., Mansson, M. O., Ohlson, S. & Mosbach, K. (1983) *Advances in Chromatography* 21 41-84.
- Lathe, G. H. & Ruthven, C. R. J. (1956) *Biochem. J.* 62 665-674.
- Laurent, T. C., Obrink, B., Hellsing, K. & Wasteson, A. (1969) *Prog. in Sep. and Purification* 2 199-218.
- Leloir, L. F. & Goldenberg, S. H. (1962) *Meth. in Enzymol.* 5, 45-147.
- Leloir, L. F., Rongine De Fekete, M. A. & Cardini, E. C. (1961) *J. Biol. Chem.* 236 636-641.
- Levin, O. (1959) *Methods Enzymol.* 5 27-32.
- Linko, M., Wallander, P. & Linko, Yu-yen (1973) *F.E.B.S. Abs.* No. 59, Dublin.
- Linggood, F. V., Matthews, A. C., Pinfield, S., Pope, C. G. & Sharland, T. R. (1955) *Nature* 176 1128.
- Loeb, S. (1961) *UCLA Engineering Report*, 42-61.
- Loeb, S., Sourirajan, S. & Yuster, S. T. (1960) *Chem. Eng. News* 38 (15) 64.
- Loeb, S. & Sourirajan, S. (1964) US Patent 3, 133-132.
- Longmore, A. P. (1968) *Proc. Fourth Int. Vac. Congr.* Pt. 1, 79-82.
- Lowe, C. R. (1979) *An Introduction to Affinity Chromatography, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. by T. S. Work & E. Work. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Lowe, C. R., Small, D. A. P. & Atkinson, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 13 33-40.
- Lowe, C. R., Clonis, Y. D., Goldfinch, M. J., Small, D. A. P. & Atkinson, A. (1982) In *Affinity Chromatography and Related Techniques*, pp. 389-398. Ed. by T. C. J. Gribnau, J. Visser & R. J. F. Nivard. Elsevier, Amsterdam.
- Mackenzie, A. P. (1966) *Bull. Parental Drug. Ass.* 20 101-129.
- Magnusson, K. E. & Edebo, L. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* 18 975-986.
- Main, R. K., Wilkins, M. J. & Cole, L. J. (1959) *Science* 129 331-332.
- Majors, R. E. (1981) In *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*. Vol. 1. Ed. by C. Horvath. pp. 00-00. Academic Press, London and New York.
- Mariy, F. & Kula, M. R. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* 16 623-634.
- Marlborough, D. I., Miller, D. S. & Cammack, K. A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 386 376-389.
- Marmur, J., Roland, R. & Schildkraut, C. L. (1963) *Prog. Nucleic Acid Res.* 1 231-300.
- Max, A. G. & Ceta-Robles, E. H. (1957) *J. Bacteriol.* 74 79-86.
- Martin, C. J. (1896) *Proc. Roy. Soc. New South Wales*, April 5th.

- Mathies, J. C. (1952) *Science* 115 144-146.
- Mazur, P. (1969) *Ann Rev. Plant Physiol.* 20 419-448.
- Mazur, P. (1970) *Science* 168 939-949.
- Melling, J. & Atkinson, A. (1972) *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22 739-744.
- Melling, J., Berkeley, R. C. W., Caulfield, M. P. & Cammack, K. A. (1978) in *Protein: Structure Function and Industrial Applications*. Ed. by E. Hoffman *et al.*, pp. 453-462. Proc. 12th FEBS meeting, Dresden.
- Melling, J., Evans C. G. T., Harris-Smith, R. & Stratton, J. E. D. (1973a) *J. Gen. Microbiol.* 77 XVIII.
- Melling, J., Downs, D. J. & Brewer, S. J. (1973b) *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 23 166.
- Melling, J. & Scott, G. K. (1972) *Biochem. J.* 130 55-66.
- Melling, J. & Westmacott, D. (1972) *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22 951-958.
- Merryman, H. T. (1966) In *Cryobiology*, pp. 609-663. Ed. by H. T. Merryman. Academic Press, New York.
- Michaels, A. S. (1965) *Ind. Eng. Chem.* 57 (10), 32-40.
- Michaels, A. S. (1968) *Ultrafiltration*. In *Progress in Separation and Purification*, Ed. by E. S. Perry. Wiley, New York.
- Mickle, H. (1948) *J. Roy. Microscop. Soc.* 68 10-12.
- Miller, G., Bach, G. & Markus, Z. (1965) *Biotechnol. Bioeng.* 7 517-528.
- Milner, H. W., Lawrence, N. S. & French, C. S. (1950) *Science* 111 633-634.
- Mitchell, P. & Moyle, J. (1956) *Soc. Gen. Microbiol. Symp. No. 6*, pp. 150-180, Cambridge University Press, London.
- Moore, J. C. (1964) *J. Polymer Sci.* B2 835-843.
- Morris, E. J. & Darlow, H. M. (1971) In *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*, pp. 687-710. Ed. by W. B. Hugo. Academic Press, London.
- Morton, R. K. (1955) *Methods Enzymol.* 1 25-51.
- Moskowitz, M. (1963) *Nature* 200 335-337.
- Nelsen, L. (1978) In *Proceedings of the International Workshop on Technology for Protein Separation and Improvement of Blood Plasma Fractionation*, pp. 133-145. Ed. by H. E. Sandberg. National Institutes of Health, Publication No. 78-1422, Washington D.C.
- Neu, H. C. & Heppel, L. A. (1967) *J. Biol. Chem.* 242 3685-3692.
- Nilsson, K. & Mosbach, K. (1980) *Eur. J. Biochem.* 112 397-402.
- Nilsson, K. & Mosbach, K. (1981) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 120 449-457.
- Oxenburgh, M. S. & Snoswell, A. N. (1965) *Nature* 203 1416-1417.
- Pauli, W. & Valko, E. (1929) *Electrochemie der Kolloide*. Springer Verlag, Vienna.
- Pearson, J. D., Lin, N. T. & Regnier, F. E. (1982) *Anal. Biochem.* 124 217-230.
- Pederson, K. O. (1962) *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.* 1 157-168.
- Penefsky, H. S. & Tzagoloff, A. (1971) *Methods Enzymol.* 22 204-219.
- Peterson, E. A. (1970) *Laboratory Techniques in Biochem. and Molecular Biology*, pp. 228-397. Ed. by T. S. Work & E. E. Eork. North Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Philpot, J. S. L. (1973) In *Methodological Developments in Biochemistry*, Vol. 2, p. 81. Ed. by E. Reid. Longmans, London.
- Polakis, P. G. & Wilson, J. E. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107 937-943.
- Pollard, E. C. (1953) In *The Physics of Viruses*. Academic Press, New York.
- Polson, A. (1953) *Biochim. Biophys. Acta* 11 315-325.
- Polson, A. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 22 61-65.
- Porath, J., Axen, R. & Ernback, S. (1967) *Nature* 215 1491-1492.
- Porath, J. & Flodin, P. (1959) *Nature* 1657-1659.
- Putnam, F. W. (1948) *Adv. in Protein Chemistry* 4 80-122.
- Ralph, R. K. & Bergquist, P. L. (1967) *Meth. in Virology* 11 465-538.
- Regnier, F. E. (1982) *Anal. Biochem.* 126 1-7.
- Regnier, F. E. & Gooding, K. M. (1980) *Anal. Biochem.* 103 1-25.
- Rehacek, J. (1971) *Experimentia* 27 Fasc 9.
- Rehacek, J., Beran, K. & Bicik, V. (1969) *Appl. Microbiol.* 17 412-466.
- Rehacek, J. & Schaeffer, J. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* 19 1523-1534.
- Ribi, E., Perrine, T., List, R., Brown, W. & Goode, G. (1959) *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 100 647-649.
- Richardson, M., Richardson, D., Ramshaw, J. A. M., Thompson, E. W. & Boulter, D. (1971) *J. Biochem. (Tokyo)* 69 811-813.
- Robinson, P. J., Wheatley, M. A., Johnson, J. Ch. & Dunnill, P. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* 16 1103-1112.
- Rosenfeld, L. (1982) *Origins of Clinical Chemistry. The Evolution of Protein Analysis*. Academic Press, New York.

- Rosenkranz, G. & Scholtan, W. (1971) Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **352** 1081-1090.
- Rowe, T. W. G. (1970) In *Current Trends in Cryobiology*, pp. 61-138. Ed. by A. U. Smith. Plenum Press, New York.
- Roy, S. K. & Nishikawa, A. H. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 775-785.
- Salton, M. R. J. (1953) *J. Gen. Microbiol.* **9** 512-523.
- Salton, M. R. J. (1964) In *The Bacterial Cell Wall*. Elsevier, Amsterdam.
- Salton, M. R. J. & Horne, R. W. (1951) *Biochim. Biophys. Acta* **7** 177-179.
- Scawen, M. D., Atkinson, A. & Darbyshire, J. (1980) In *Applied Protein Chemistry*, pp. 281-324. Ed. by R. A. Grant. Applied Science Publishers, Essex, U.K.
- Scawen, M. D., Darbyshire, J., Harvey, M. J. & Atkinson, T. (1982) *Biochem. J.* **203** 699-705.
- Scawen, M. D., Hammond, P. M., Comer, M. J. & Atkinson, T. (1983) *Anal. Biochem.* **132** 413-417.
- Schantz, E. J., Ressler, W. G., Woodburn, M. J., Lunch, J. M., Jacoby, H. M., Scoble, H. A. & Brown, P. R. (1983) In *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, vol. 3, pp. 2-49. Ed. by C. Horvath. Academic Press, London and New York.
- Schmiedt, A. (1861) *Poggendorff Ann.* **114** 337.
- Scoble, H. A. and Brown, P. R. (1983) In *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, vol. 3, pp. 2-49. Ed. by C. Horvath. Academic Press, London and New York.
- Scouten, W. H. (1980) *Affinity Chromatography, Bioselective Adsorption on Inert Matrices*.

John Wiley and Sons, New York.

- Shaltiel, S. (1974) *Methods Enzymol.* **34** 126-.
- Shaltiel, S. & Erel, Z. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70** 778-781.
- Shaw, D. J. (1969) *Electrophoresis*. Academic Press, London.
- Sherman, J. M. & Albus, W. R. (1923) *J. Bact.* **8** 127-139.
- Shockman, G. D., Kolb, J. J. & Toennies, G. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* **24** 203-204.
- Silverman, S. J., Gorman, J. C. & Spero, L. (1972) *Biochemistry* **11** 360-366.
- Sluyterman, L. A. A. E. & Elgersma, O. (1978) *J. Chromatogr.* **150** 17-30.
- Sluyterman, L. A. A. E. & Wijndes, J. (1978) *J. Chromatogr.* **150** 31-44.
- Sluyterman, L. A. A. E. (1982) *Trends Biochem. Sci.* **7** 168-170.
- Small, D. A. P., Atkinson, T. & Lowe, C. R. (1983) *J. Chromatogr.* **266** 151-156.
- Snoswell, A. M. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **77** 7-19.
- Speck, M. L. & Cowman, R. A. (1969) In *Freezing and Drying of Microorganisms*, pp. 39-51. Ed. by Nei. University of Tokio Press, Tokio.
- Steers, R. L. & Ackers, G. K. (1962) *Nature* **196** 457-476.
- Strange, R. E. (1964) *Nature* **203** 1304-1305.
- Strange, R. E. & Dauk, F. A. (1962) *J. Gen. Microbiol.* **29** 719-730.
- Strange, R. E. & Ness, A. G. (1963) *Nature* **197** 819.
- Sundberg, L. & Porath, J. (1974) *J. Chromatogr.* **90** 87-98.
- Swingle, S. M. & Tiselius, A. (1951) *Biochem. J.* **48** 171-174.
- Takahashi, T. & Adachi, Y. (1982) *J. Biochem. (Tokyo)* **91** 1719-1724.
- Tanford, C. & Louvrein, R. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* **84** 1892-1896.
- Thompson, A. R., Mattock, P. & Aitchison, G. F. (1980) In *Electrophoresis '79*, pp. 591-605. Ed. by B. J. Radola. Walter de Gruyter, Berlin.
- Tiselius, A., Hjerken, S. & Levin, O. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* **65** 132-155.
- Trim, A. R. (1959) *Biochem. J.* **73** 298-304.
- Turkova, J. (1978) *Affinity Chromatography, Journal of Chromatography Library*, vol. 12. Elsevier, Amsterdam.
- Tzagoloff, A. & Penefsky, H. S. (1971) *Methods Enzymol.* **22** 219-230.
- Unger, K. K. (1978) *Porous Silica: Its Properties and use of a Support in Column Liquid Chromatography*. Elsevier, Amsterdam.
- Van Oss, C. J. (1970) *Prog. in Sep. and Purif.* **3** 97-128.
- Wade, H. E. (1968) British Patent Appl. No. 40344/68.
- Wheaton, R. M. & Baumann, W. L. (1953) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **57** 159-176.
- Wieme, R. J. (1965) *Agar-Gel Electrophoresis*. Elsevier, Amsterdam.
- Winchester, B. G., Caffrey, M. & Robinson D. (1971) *Biochem. J.* **121** 161-168.
- Woodrow, J. R. & Quirk, A. V. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* **4** 385-389.
- Yamanaka, T. & Okunuki, K. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **67** 379-393.

第3章

- Abbott, B. J., Cerimela, B. & Fukuda, D. S. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* **18** 1033-1042.
- Adachi, S., Hashimoto, K., Miyai, H., Kurome, R., Matsuno, R. & Kamikubo, T. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 1961-1976.
- Adler, D., Lim, H., Cottle, D. & Emery, A. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1345-1359.
- Aidercreutz, P. & Matthiasson, B. (1982) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16** 165-170.
- Aizawa, M., Wada, M., Kato, S. & Suzuki, S. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1769-1783.
- Alberti, B. N. & Klibanov, A. M. (1982) *Enzyme & Microbial. Technol.* **4** 47-49.
- Archer, M. C., Ragnarsson, J. O., Tannenbaum, S. R. & Wang, D. I. C. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* **15** 181-196.
- Atkinson, B. (1974) in: *Biochemical Reactors*, Pion Press Ltd. pp. 191-214.
- Banghn, R. L. & Whitesides, G. M. (1981) *J. Amer. Chem. Soc.* **103** 4890-4899.
- Baret, J. L. A. G. (1980). Patent Applic. GB 2065137A assigned to Corning Glass Works, Corning, N.Y.
- Benoit, M. R. & Kohler, J. T. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17** 1617-1626.
- Betz, T. L., Brown, P. R., Smyth, M. J. & Clarke, P. H. (1974) *Nature* **247** 261-264.
- Bhasin, D. P., Gryte, C. G. & Studebaker, J. F. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* **18** 1777-1792.
- Bickerstaff, G. F. (1984) *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* Vol. 9, Chapter 4, pp. 162-201, Ellis Horwood Limited.
- Blake, C. C. F., Johnson, L. N., Main, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. & Sharma, V. R. (1967) *Proc. Royal Soc. London* **B167** 378-388.
- Bucke, C. (1977) in *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* 1, (Ed. Wiseman, A.), Ellis Horwood Limited, pp. 147-168.
- Buckland, B. C., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17** 815-826.
- Bunting, P. S. & Laidler, K. J. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 119-134.
- Butler, L. C. (1979) *Enzyme & Microbial. Technol.* **1** 253-259.
- Brodelius, P., Deus, B., Mosbach, K. & Zenk, M. H. (1979) *FEBS Lett.* **103** 93-97.
- Carleysmith, S. W. & Lilly, M. D. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1057-1073.
- Carleysmith, S. W., Eames, M. B. L. & Lilly, M. D. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 957-967.
- Carrea, G., Colombi, F., Mazzola, G., Cremonesi, P. & Antonini, E. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 39.
- Chang, T. M. S., Yu, Y. Y. & Grunwald (1982) in: *Enzyme Engineering*. (Chibata, I., Saburo, F. & Wingard Jr, L. B., eds.) Plenum Press, Vol. 6 451-456.
- Chang, T. M. S. (ed.) (1977) *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*. Vols. 1 & 2: Plenum Press, New York.
- Charles, M., Coughlen, R. W. & Hasselberger, F. X. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **11** 1553-1556.
- Cheetham, P. S. J. (1980) in *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Vol. 4 (Ed. Wiseman, A.) Ellis Horwood Limited, pp. 189-238.
- Cheetham, P. S. J., Blunt, K. W. & Bucke, C. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 2155-2168.
- Cheetham, P. S. J., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1982) *Biochem. J.*, **201** 515-521.
- Cheetham, P. S. J. *Enz. and Microb. Technol.* **1** 183-188.
- Cheetham, P. S. J., Imber, C. E. & Isherwood, J. (1982) *Nature* **299** 628-631.
- Cheyen, M., Vay Wyk, P. J., Ohlson, N. F. & Richardson, T. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17** 585-598.
- Chibata, I., Tosa, T. & Sato, T. (1967) in: *Methods in Enzymology* Vol. 44 (Ed. Mosbach, K.) Academic Press, pp. 739-746.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. & Mori, T. (1976) *Methods in Enzymology*, Vol. 44 (Ed. Mosbach, K.): Academic Press, pp. 746-759.
- Chiga, M. & Plaut, G. W. E. (1960) *J. Biol. Chem.* **235** 3260.
- Cohen, G. N. & Monod, J. (1957) *Bacteriol. Rev.* **21** 169-174.
- Coleman, D. R. & Royer, G. P. (1980) **45** 2268.
- Coulson, J. M. & Richardson, J. F. (1970) *Chemical Engineering* 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, pp. 1-19.
- Cousineau, J. & Chang, T. M. S. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79** 24-31.
- Cremonesi, P., Carrea, G., Sportoletti, G. & Antonini (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* **159** 7-10.
- Cremonesi, P., Carrea, G., Ferrara, L. & Antonini, E. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17** 1101-

- D'Souza, S. F. & Nadkarni, G. B. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 79-2190.
- Dixon, M. & Webb, E. C. (1979) *The Enzymes*. 3rd ed. Longmans Group, London.
- Duvnjak, Z. & Lilly, M. D. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* **18** 737-740.
- Engasser, J. M. & Horvath, C. (1975) *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **14** 107-110.
- Fersht, A. R. (1977) *Enzyme structure and mechanism* W. H. Freeman, San Francisco.
- Fersht, A. R. (1980) in: *Enzymic and Non-enzymic Catalysis* (ed. Dunnill, P., Wiseman, A. & Blakeborough, N.) Ellis Horwood Limited/Society of Chemical Industry, pp. 13-27.
- Fersht, A. R. & Kaethner, M. M. (1976) *Biochemistry* **15** 3342-3346.
- Freeman, A. & Aharonowitz (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 2747-2759.
- Fullbrook, P. & Slcombe, B. (1970) *Nature* **226** 1054.
- Fullbrook, P. (1983) in *Ind. Enzymol.* (eds. Godfrey, A. & Reichelt, J.); Macmillan 8-40.
- Gelft, G. & Boudrant, J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **334** 467-.
- Genung, R. K. & Hsu, H. W. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1129-1142.
- Ghose, T. K. & Chand, S. (1978) *J. Ferm. Technol.* **56** 315-322.
- Giard, D. J., Loeb, P. H., Tilly, W. G., Wang, D. I. C. & Levine, D. W. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 433-442.
- Guilbault, G. G. (1970) *Enzymatic Methods of Analysis*, Pergamon Press, Long Island City, New York.
- Guilbault, G. (1980) *Enz. and Microbiol. Technol.* **2** 258-264.
- Gupta, K. G., Jain, A. K. & Dhawan, S. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 649-658.
- Gutfreund, H. (1972) *Enzymes: Physical Principles*, Wiley-Interscience.
- Hahn-Hagerdal, B. & Mattiasson, B. (1982) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14** 140-143.
- Halling, P. J. & Dunnill, P. (1979) *Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **6** 195-205.
- Halling, P. J. & Dunnill, P. (1980) *Enz. & Microbiol. Technol.* **2** 2-10.
- Hattori, R. (1973) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18** 319-325.
- Hayashi, T., Tanaka, Y. & Kavashima, K. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1019-1030.
- Henry, S., Koczan, J. & Richardson, T. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 289-291.
- Hofmann, J. & Sernatz, M. (1983) *Trends in Anal. Chem.* **2** 172-175.
- Holst, O., Enfors, S. O. & Mattiasson, B. (1982) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14** 64-68.
- Horvath, C. & Engasser, J. M. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 909-923.
- Ingalls, R. G., Squires, R. G. & Butler, L. B. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17** 1627-1637.
- Jones, A. & Veliky, I. A. (1981) *Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotech.* **13** 84-89.
- Jones, J. B. (1976a) in: *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry* (Jones, J. B., Sih, C. J. & Perlman, D. eds.) John Wiley, Chapters 1 and 6.
- Jones, J. B. (1976b) in: *Methods in Enzymology* **44** (Ed. Mosbach, K.) Academic Press 831-844.
- Jowitt, R. (Ed.) (1980) *Hygienic design & operation of food plant*. Ellis Horwood Limited.
- Karube, I., Suganama, T. & Suzuki, S. (1977a) *Biotechnol. Bioeng.* **19** 301-309.
- Karube, I., Suganama, T., Tsuru, S. & Suzuki, S. (1977b) *Biotechnol. Bioeng.* **19** 1727-1734.
- Karube, I., Mitsuda, S. & Suzuki, S. (1979a) *Eur. J. Microbiol. and Biotechnol.* **7** 343-350.
- Karube, I., Aizawa, K., Ieda, S. & Suzuki, S. (1979b) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 253-260.
- Karube, I., Otsuka, T., Kayano, H., Matsunaga, T. and Suzuki, S. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 2655-2665.
- Karube, I., Matsunaga, T., Otomine, Y. & Suzuki, S. (1981) *Enz. & Microbiol. Technol.* **3** 309-312.
- Kashe, V. (1983) *Enz. Microb. Technol.* **5** 2-13.
- Kashe, V. & Galunsky, B. (1982) *Biochem. Biophys. Res Commun.* **104** 1215-1222.
- Kierstan, M. & Bucke, C. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 387.
- Kirwan, D. J., Enright, J. T. & Gainer, J. L. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 551-553.
- Klibanov, A. M. & Puglisi, A. W. (1980) *Biotech. Lett.* **2** 445-450.
- Klibanov, A. M., Samokhin, G. P., Martinek, K. & Berezin, I. V. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* **19** 211-218.
- Kluepfel, D., Biron, L. & Ishaque, M. (1980) *Biotechnol. Lett.* **2** 309-314.
- Kobayashi, T. & Moo-Young, M. (1971) *Biotechnol. Bioeng.* **13** 893-910.
- Kobayashi, T., Katagiri, K., Ohmiya, K. & Shiniau, S. (1980) *J. Ferm. Technol.* **58** 23-31.
- Koch-Schmidt, A.-C. & Mosbach, K. (1977) *Biochem.* **16** 2101.
- Koch-Schmidt, A.-C., Mosbach, K. & Werber, M. M. (1979) *Eur. J. Biochem.* **100** 213.
- Kokubu, T., Karube, I. & Suzuki, S. (1978) *Eur. J. Appl. Microbiol.* **5**, 233-240.
- Kokubu, T., Karube, I. & Suzuki, S. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 29-41.
- Kuhn, I. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 2393-2398.

- Lawrence, R. L. & Ökay, V. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* **15** 217-221.
- Legoy, M. D., Larreta Garde, V., Le Moullerc J. M., Ergon, F. & Thomas, D. (1980) *Biochemie* **62** 341.
- Levine, H. L., Jakagawa, Y. & Kaiser, E. T. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **76** 64-70.
- Lilly, M. D. (1983) *Phil. Trans. Royal Soc.* **B300** 391-397.
- Lilly, M. D. and Sharp, A. K. (1968) *Chem. Eng. (Lond.)* **215** CE12-19.
- Lilly, M. D. & Dunnill, P. (1972) *Proc. Biochem. Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 3* 221-227.
- Lim, F. & Sun, A. M. (1980) *Science* **210** 908-910.
- Maneepum, S. & Klivanov, A. M. (1982) *Biotechnol. Bioeng.* **24** 483-486.
- Marsh, D. R. & Tsao, G. T. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* **18** 349-362.
- Mansson, M. O., Larsson, P.-O. & Mosbach, K. (1978, 1979) *Eur. J. Biochem.* **86**, 455 and *FEBS Lett.* **98**, 309 resp.
- Marshall, D. L. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* **15** 447-453.
- Marshall, V. J. & Humphries, J. D. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* **19** 1739-1760.
- Martin, C. K. A. & Perlman, D. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* **18** 217-237.
- Martinek, K., Moxhaev, V. V., Smirnov, M. D. & Berezin, I. U. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 249-251 (also *Bioorg Khim* (1980) **6** 600).
- Mattiasson, B. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* **19** 777-780.
- Merrill, A. M. & McCormick, D. B. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1629-1638.
- Monroe, P. A., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* **19** 101-124.
- Monroe, P. A., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 677-689.
- Monti, J. C. & Jost, R. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1173-1185.
- Morikawa, Y., Karube, I. & Suzuki, S. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1015-1023.
- Mosbach, K. (1978) *Adv. Enzymol.* **46**, 205-278.
- Murata, K., Tani, K., Kato, J. & Chibata, I. (1978) *Eur. J. Applied Microbiol.* **6** 23-27.
- Murata, K., Kato, J. & Chibata, I. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 887-895.
- Murata, K., Tani, K., Kato, J. & Chibata, I. (1981) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11** 72-77.
- Musgrave, S. C., Kerby, N. W., Codd, G. A. & Stewart, W. O. P. (1982) *Biotech. Letts.* **4** 647-652.
- Nasimova, R. P., Belousova, T. O. & Gilyazova, R. M. (1982) *Appl. Biochem. & Microbiol.* **18**, 73-77.
- Nilsson, I., Ohlson, S., Haggstrom, L., Molin, N. & Mosbach, K. (1980) *Eur. J. Appl. Microbiol. & Biotechnol.* **10** 261-274.
- Ohlson, S., Larsson, P. O. & Mosbach, K. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1267-1284.
- Ohlson, S., Larsson, P. O. & Mosbach, K. (1979) *Eur. J. Appl. Microbiol.* **7** 103-110.
- Omata, T., Iwamoto, N., Kimura, T., Tanaka, A. & Fukui, S. (1981) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11** 199-204.
- Page, M. I. & Jencks, W. P. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **68** 1678.
- Park, S. H., Lee, S. B. & Ryu, D. D. Y. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 1237-1254.
- Pastore, M. & Morisi, F. (1976) in: *Methods in Enzymol.* **44**, (Ed. Mosbach, K.) Academic Press, pp. 822-830.
- Patty's Industrial Hygiene and Toxicology (3rd edn.) 3 Vols. 1978-80. Wiley-Interscience.
- Pitcher, W. H. (1978) in *Advances in Biochemical Engineering* **10** (Ed. Ghose, T. K., Fiechter, A. & Blakeborough, N.) Springer Verlag, p. 1-26.
- Pitcher, W. H. (1978) in: *Enzyme Engineering* **4** (Ed. Broun, G. B., Manecke, G. & Wingard, L. B.) Plenum Press, pp. 67-76.
- Poulsen, G. & Zittan, L. (1976) in *Methods in Enzymology* **44** (Ed. Mosbach, K.). Academic Press, 809-821.
- Regan, D. L., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 333-343.
- Regan, R. (1977) Stone & Webster Biochem. Symp. Toronto, paper 2.
- Roland, J. F. (1981) *Enz. and Microbiol. Technol.* **3** 105-110.
- Ryu, D. D. Y. & Mandels, M. (1980) *Enz. and Microbiol. Technol.* **2** 91-102.
- Sada, E., Katoh, S. & Terashima, M. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 243-246.
- Sada, E., Katoh, S., Shiozawa, M. & Fukui, T. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 2561-2567.
- Sandermann, H. (1974) *Eur. J. Biochem.* **43** 415.
- Sarawathi, S. & Keyes, M. H. (1984) *Enzyme & Microbial Technol.* **6** 98-100.
- Sato, T., Mori, T., Tosa, T., Chibata, I., Karai, M., Yamashita, K. & Sumi, A. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17** 1797-1804.
- Sato, T., Tosa, T. & Chibata, J. (1976) *Eur. J. Appl. Microbiol.* **2** 153-160.
- Satoh, I., Karube, I. & Suzuki, S. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* **18** 269-272.
- Schneider, Z. & Friedman, H. C. (1981) *J. Appl. Biochem.* **3** 135-146.
- Schwartz, R. D. & McCoy, C. J. (1977) *J. Appl. Envir. Microbiol.* **34** 47,

- Seliger, H., Teufel, E. H. & Philipp, M. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 22 55-64.
- Semenov, A. N., Berezin, I. V. & Martinek, K. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* 23 355-360.
- Shimizu, S., Morioko, H., Tani, Y. & Ogita, K. (1975) *J. Ferm. Technol.* 53 77-83.
- Slima, J. T., Oruganti, S. R. & Kaiser, E. T. (1981) *J. Amer. Chem. Soc.* 103 6211-6213.
- Soloman, B., Moaw, N., Pines, G. & Karchalski-Katir, E. (1984) *Mol. Immunol.* 21, 1-11.
- Srere, P. A., Mattiasson, B. & Mosbach, K. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)* 70 1534-1538.
- Stoddart, J. F. (1980) in: *Enzymic and Non-enzymic catalysis* (Ed. Dunnill, P., Wiseman, A. & Blakeborough, N.) Ellis Horwood Limited, pp. 84-109.
- Szalay, A. A., Mackay, C. J. & Langridge, W. H. R. (1979) *Enz. and Microbiol. Technol.* 1 153-224.
- Tramper, J., Muller, F. & Van der Plas, H. C. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* 20 1507-1522.
- Van Beynum, G. M. A., Roels, J. A. & Van Tilburg, R. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 22 643-649.
- Van Ginkel, C. G., Tramper, J., Layket, K. Ch. A. M. & Klapwicz, A. (1983) *Enzyme & Microbial Technol.* 5 297-303.
- Venkatasubramanian, K., Constantinides, A. & Vieth, W. R. (1978) in: *Enzyme Engineering* 3 (Ed. Pye, E. K. & Weetall, H. H.) Plenum Press, p. 29-43.
- Venkatasubramanian, K. (1980) in *Food Process Engineering* 2 (Ed. Linko, P. & Arinkari, J.) Applied Science.
- Verhoff, F. H. & Schlager, S. T. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* 23 41-60.
- Vernon, C. A. (1967) *Proc. Royal Soc. London* B167 448.
- Vieth, W. R. & Venkatasubramanian, K. (1976) in: *Methods in Enzymology* 44 (Ed. Mosbach, K.) Academic Press, pp. 768-776.
- Wada, M., Uchida, T., Kato, J. & Chibata, I. (1980a) *Biotechnol. Bioeng.* 22 1175-1188.
- Wada, M., Kato, J. & Chibata, I. (1980b) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 275-257.
- Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Humphrey, A. E. & Lilly, M. D. (1979) *Ferm. & Enz. Tech. J. Wiley Ltd.*
- White, F. H. & Portno, A. D. (1978) *J. Inst. Brew.* 84 228-230.

- White, C. A. & Kennedy, J. F. (1980) *Enz. & Microbial. Technol.* 2 82-90.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A. F. & Kula, M. R. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* 23 2789-2802.
- Wilkinson, A. J., Fersht, A. R., Blow, D. M., Carter, P. & Winter, G. (1984) *Nature* 307, 187-8.
- Wilson, M. E. & Whitesides, G. M. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* 100 306-307.
- Winter, G., Fersht, A. R., Wilkinson, A. J., Zoller, M. & Smith, M. (1982) *Nature* 299, 756-758.
- Wiseman, A. (1984) in: *Topics In Enzyme and Fermentation Biotechnology* Vol. 9. (Ed. Wiseman, A.) Ellis Horwood Limited, pp. 202-212.
- Wong, C., Daniels, L., Orme-Johnson, W. H. & Whitesides, G. M. (1981a) *J. Amer. Chem. Soc.* 103 6227-6228.
- Wong, C. H., Gordon, H., Cooney, C. L. & Whitesides, G. M. (1981b) *J. Org. Chem.* 46 4676-4679.
- Wykes, J. R., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 17 51-68.
- Yamamoto, K., Sato, T., Tosa, T. & Chibata, I. (1974a) *Biotechnol. Bioeng.* 16 1589-1599.
- Yamamoto, K., Sato, T., Tosa, T. & Chibata, I. (1974b) *Biotechnol. Bioeng.* 16 1601-1610.
- Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K. & Chibata, I. (1976) *Eur. J. Appl. Microbiol* 3 169-183.
- Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K. & Chibata, I. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* 19 1101-1114.
- Yourno, J., Koho, T. & Roth, J. R. (1970) *Nature* 228 820-824

第 4 章

- Abdel-Hay, F. I., Beddows, C. G. & Guthrie, J. T. (1980) *Polymer Bull. (Berlin)* 2 607-612.
- Adachi, S., Kawamura, Y., Nakamishi, K., Matsuno, R. & Kamikubo, T. (1978) *Agric. Biol. Chem.* 42 1707-1714.
- Adachi, S., Hashimoto, K., Matsuno, R., Nakanishi, K. & Kamikubo, T. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 22 779-797.

- Adamich, M., Voss, H. F. & Dennis, E. A. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **189** 417-423.
- Ahn, B. K., Wolfson, S. K. Jr. & Yao, S. J. (1975) *Bioelectrochem. Bioenergetics* **2** 142.
- Allen, B. R., Charles, M. & Coughlin, R. W. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 689-706.
- Arrio-Dupont, N. & Coulet, P. R. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **89** 345-352.
- Aukati, M. F., Kalashnikov, T. I., Bubenshchikova, S. N., Kagramanova, V. K. & Baratova, L. A. (1978) *Vestn. Mosk. Univ. Ser. 2* **19** 350-352.
- Avrameas, S. & Ternynck, T. (1969) *Immunochem.* **6** 53-66.
- Barattini, J., Couderc, R., Cooney, C. L. & Wang, D. I. C. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 333-348.
- Barbotin, J.-N. & Breuil, M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **525** 18-27.
- Barbotin, J.-N. & Thomasset, B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **570** 11-21.
- Barker, S. A., Doss, S. H., Gray, C. J., Kennedy, J. F., Stacey, M. & Yeo, T. H. (1971) *Carbohydr. Res.* **20** 1-7.
- Bartoli, F., Bianchi, G. E. & Zaccardelli, D. (1978) In: *Enzyme Engineering*, Vol. 4, p. 279-280. Ed. by Broun, G. B., Manecke, G. & Wingard, L. B. Jr. Plenum Press, New York.
- Beddows, C. G., Mirauer, R. A., Guthrie, J. T., Abdel-Hay, F. I. & Morrish, C. E. J. (1979) *Polym. Bull. (Berlin)* **1** 749-753.
- Beddows, C. G., Mirauer, R. A. & Guthrie, J. T. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 311-321.
- Beddows, C. G., Guthrie, J. T. & Abdel-Hay, F. I. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 2885-2889.
- Beitz, J., Schellenberger, A., Lasch, J. & Fischer, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **612** 451-454.
- Bernfeld, P. & Wan, J. (1963) *Science* **142** 678-679.
- Besserlich, H., Kinstein, D. & Kahrig, E. (1980) *Chem. Tech. (Leipzig)* **32** 243-247.
- Bessmertnaya, L. Ya. & Antonov, V. K. (1973) *Khim. Proteoliticheskikh Fermentov, Mater. Vser. Simp.* **43**-44.
- Bhatt, B. R., Joshi, S. & Kothari, R. M. (1979) *Enzyme Microb. Technol.* **1** 113-116.
- Bisse, E. & Vonderschmidt, D. J. (1977) *FEBS Letts.* **81** 326-330.
- Bisse, E. & Vonderschmidt, D. J. (1978) *FEBS Letts.* **93** 102-104.
- Blassberger, D., Freeman, A. & Goldstein, L. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 309-315.
- Bogatskii, A. V., Davidenko, T. I., Chuenko, A. V., Vanishpol'skii, V. V., Tertykh, V. A. & Chuiko, A. A. *Ukr. Biochem. Zh.* **51** 315-317.
- Bohnenkamp, C. G. & Reilly, P. J. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1753-1758.
- Bohmeier, J. P. & Middleman, S. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 2303-2321.
- Boudillon, C., Bourgeois, J.-P. & Thomas, D. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1877-1879.
- Brummer, W., Hennrich, N., Klockow, M., Lang, H. & Orth, H. D. (1972) *Eur. J. Biochem.* **25** 129-135.
- Broun, G. B. (1976). In: *Methods in Enzymology* Vol. 44, p. 263-280. Ed. by Mosbach, K. Academic Press, New York.
- Buchholz, K. & Gödelmann, B. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1201-1220.
- Buchholz, K., Duggal, S. K. & Borchert, A. (1979) *Dechema Monogr.* **84** 169-181.
- Cabral, J. M. S., Cardoso, J. P. & Novais, J. M. (1981) *Enzyme Microb. Technol.* **3** 41-45.
- Cabral, J. M. S., Kennedy, J. F. & Novais, J. M. (1982a) *Enzyme Microb. Technol.* **4** 337-342.
- Cabral, J. M. S., Kennedy, J. F. & Novais, J. M. (1982b) *Enzyme Microb. Technol.* **4** 343-348.
- Campbell, J. & Chang, T. M. S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **397** 101-109.
- Campbell, J. & Chang, T. M. S. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **69** 562-569.
- Cantarella, M., Gianfreda, L., Palescondolo, R., Scardi, V., Greco, G., Alfani, F. & Ieri, G. (1977) *J. Solid-Phase Biochem.* **2** 163-174.
- Cardoso, J. P., Chaplin, M. F., Emery, A. N., Kennedy, J. F. & Revel-Chion, L. P. (1978) *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **28** 775-785.
- Carleysmith, S. W. & Lilly, M. D. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1057-1073.
- Carleysmith, S. W., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 735-756.
- Carr, P. W. & Bowers, L. D. (1980) *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, Wiley, New York.
- Carrea, G., Colombi, F., Mazzola, G., Cremonesi, P. & Antonini, E. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 39-48.
- Carvajal, N., Martinez, J., de Oca, F. M., Rodriguez, J. & Fernandez, M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **527** 1-7.
- Chang, H. N. & Reilly, P. J. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 243-253.
- Chang, T. M. S. (1964) *Science* **146** 524-525.
- Chang, T. M. S. (1973) *Enzyme* **14** 95-104.

- Chaplin, M. F. & Kennedy, J. F. (1976) *Carbohydr. Res.* **50** 267-274.
- Charles, M., Coughlin, R. W. & Hasselberger, F. X. (1974), *Biotechnol. Bioeng.* **16** 1555-1556.
- Cheetham, N. W. H. & Richards, G. N. (1973) *Carbohydr. Res.* **30** 99-107.
- Cheetham, P. S. J. (1979) *J. Appl. Biochem.* **1** 51-59.
- Chen, A. K., Liu, C. C. & Schiller, J. G. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1905-1915.
- Cho, Y. K. & Bailey, J. E. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1651-1665.
- Cho, Y. K. & Bailey, J. E. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 461-476.
- Corno, C., Galli, G., Morisi, F., Bettonte, M. & Stopponi, A. (1972) *Stärke* **24** 420-424.
- Coulet, P. R., Sternberg, R. & Thévenot, D. R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **612** 317-327.
- Daka, N. J. & Laidler, K. J. (1980) *Biochem. Biophys. Acta* **612** 305-316.
- Dale, B. E. & White, D. H. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1639-1648.
- Danielson, N. D. & Siergiej, R. W. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 1913-1917.
- Danielsson, B., Mattiasson, B., Karlsson, R. & Winqvist, F. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1749-1766.
- Dayhoff, M. O. & Hunt, L. T. (1972). In *Atlas of Protein Sequence and Structure* Vol. 5,

National Biomedical Res. Fdn., Washington, D.C.

- Dinelli, D. (1972) *Process Biochem.* **7**(8) 9-12.
- Dinelli, D., Marconi, W., Cecere, F., Galli, G. & Morisi, F. (1978). In: *Enzyme Engineering*, Vol. 3, p. 477-481. Ed. by Pye, E. K. & Weetall, H. H., Plenum Press, New York.
- Dixon, J., Andrew, P. & Butler, L. G. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 2113-2123.
- Drobnik, J., Sunde, V., Švec, F., Kálal, J., Vojtišek, V. & Bárta, M. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1317-1332.
- D'Souza, S. F. & Nadkarni, G. B. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 431-436.
- Emery, A. N. & Cardoso, J. P. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1903-1929.
- Epton, R., McLaren, J. V. & Thomas, T. H. (1972) *Carbohydr. Res.* **22** 301-306.
- Epton, R., Hobson, M. E. & Marr, G. (1979) *Enzyme Microb. Technol.* **1** 37-40.
- Erekin, N. & Friedmann, M. E. (1979) *J. Solid-Phase Biochem.* **4** 123-130.
- Finlay, T. H., Troll, V., Levy, M., Johnson, A. J. & Hodgkins, L. T. (1978) *Analyt. Biochem.* **87** 77-90.
- Fischer, J., Ulbrich, R. & Schellenberg, A. (1978) *Acta Biol. Med. Ger.* **37** 1413-1424.
- Flynn, A. & Johnson, D. B. (1977) *Int. J. Biochem.* **8** 243-247.
- Flynn, A. & Johnson, D. B. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1445-1454.
- Friedrich, O. H., Chun, M. & Sernetz, M. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 157-175.
- Fukul, S., Tanaka, A. & Gelfi, G. (1978). In *Enzyme Engineering*, Vol. 4, p. 299-306. Ed. by Bröun, G. B., Manecke, G. and Wingard, L. B. Jr., Plenum Press, New York.
- Fukushima, S., Nagai, T., Fujita, K., Tanaka, A. & Fukui, S. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1465-1469.
- Garbers, D. L. (1978) *J. Cyclic Nucleotide Res.* **4** 271-279.
- Giovenco, S., Norisi, F. & Pansolli, P. (1973) *FEBS Lett.* **36** 57-60.
- Glazer, A. N., Bar-Eli, E. & Katchalski, E. (1962) *J. Biol. Chem.* **237** 1832-1838.
- Goldstein, L., Lifschitz, A. & Sokolovsky, M. (1971) *Int. J. Biochem.* **2** 440-456.
- Gondo, S. & Koya, H. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 2007-2010.
- Gondo, S., Morishita, M. & Osaki, T. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1287-1291.
- Goodman, R. B. & Peanasky, R. J. (1982) *Analyt. Biochem.* **120** 387-393.
- Gouges, Y., Amen, J. & Sebesi, S. (1979). French Patent, 2, 420, 542.
- Gray, C. J., Livingstone, C. M., Jones, C. M. & Barker, S. A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **341** 457-464.
- Greco, G., Albanesi, D., Cantarella, M. & Scardi, V. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 215-219.
- Gregoriadis, G., Leathwood, P. D. & Ryman, B. E. (1971) *FEBS Lett.* **14** 95-99.
- Grunwald, P., Gunssen, W., Heiker, F. R. & Roy, W. (1979) *Analyt. Biochem.* **100** 54-57.
- Guiraud, J. P., Demeulle, S. & Galzy, P. (1981) *Biotechnol. Lett.* **3** 683-688.
- Halling, P. J. & Dunnill, P. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 393-416.
- Halling, P. J., Asenjo, J. A. & Dunnill, P. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 2359-2363.
- Halwachs, W., Wandrey, C. & Schugert, K. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 541-554.
- Hanish, W. H., Rickard, P. A. D. & Nyo, S. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 95-106.
- Hatchikian, E. C. & Monsan, P. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **92** 1091-1096.
- Hirao, S. & Miura, O. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 711-714.
- Horiuti, Y. & Imamura, S. (1978) *J. Biochem.* **83** 1381-1385.
- Huitron, C. & Limon-Lason, J. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1377-1391.
- Iborra, J. L., Manjón, A. & Lozano, J. A. (1977) *J. Solid-Phase Biochem.* **2** 85-96.
- Iborra, J. L., Manjón, A., Tari, M. & Lozano, J. A. (1979) *Gen. Pharmacol.* **10** 143-145.
- Iyengar, L. & Rao, A. V. S. P. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1333-1343.
- Jackson, J. A., Halvorsen, H. R., Furlong, J. W., Lucast, K. D. & Shore, J. D. (1979) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **209** 271-274.

- Jahásik, V., Bartha, F., Kretschmer, K. & Lash, J. (1978) *J. Solid-Phase Biochem.* **3** 291-299.
- Johnson, D. B. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1117-1123.
- Johnson, D. B. & Coughlan, M. P. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1085-1095.
- Kaboli, H. & Reilly, P. J. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1055-1069.
- Kaetsu, I., Kumakura, M. & Yoshida, M. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 847-861.
- Karube, I., Hirano, K. I. & Suzuki, S. (1977a) *J. Solid-Phase Biochem.* **2** 41-44.
- Karube, I., Suzuki, S., Kusano, T. & Sato, I. (1977b) *J. Solid-Phase Biochem.* **2** 273-278.
- Katchalski, E. & Sela, M. (1958) *Advances Protein Chem.* **13** 243-492.
- Katchalski, E., Silman, I. & Goldman, R. (1971) *Advances Enzymol.* **34** 445-536.
- Keller, E., Eberspächer, J. & Lingens, F. (1979) *Z. Physiol. Chem.* **360** 19-25.
- Kennedy, J. F. (1978) In *Enzyme Engineering*, Vol. 4, p. 323-328. Ed. by Broun, G. B., Manecke, G. & Wingard, L. B. Jr. Plenum, New York.
- Kennedy, J. F. (1979) *Chem. Soc. Rev.* **8** 221-257.
- Kennedy, J. F. & Cabral, J. M. S. (1983), In *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 4, 189-280. Ed. by Wingard, L. B. & Chibata, I. Academic Press, New York.
- Kennedy, J. F. & Chaplin, M. F. (1979) *Enzyme Microb. Technol.*, **1** 197-200.
- Kennedy, J. F. & Doyle, C. E. (1973) *Carbohydr. Res.* **28** 89-92.
- Kennedy, J. F. & Epton, J. (1973) *Carbohydr. Res.* **27** 11-20.
- Kennedy, J. F. & Humphreys, J. D. (1976) *Antimicrob. Agents Chemother.* **9** 766-770.
- Kennedy, J. F. & Kalogerakis, B. (1980) *Biochimie* **62** 549-561.
- Kennedy, J. F. & Kay, I. M. (1976) *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** 329-335.
- Kennedy, J. F. & Kay, I. M. (1977a) *Carbohydr. Res.* **56** 211-218.
- Kennedy, J. F. & Kay, I. M. (1977b) *Carbohydr. Res.* **59** 553-561.
- Kennedy, J. F. & Pike, V. W. (1978) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1** 1058-1066.
- Kennedy, J. F. & Pike V. W. (1979) *Enzyme Microb. Technol.* **1** 31-36.
- Kennedy, J. F. & Pike, V. W. (1980) *Enzyme Microb. Technol.* **2** 288-294.
- Kennedy, J. F. & Watts, P. M. (1974) *Carbohydr. Res.* **32** 155-160.
- Kennedy, J. F. & White, C. A. (1979) *Stärke* **31** 375-381.
- Kennedy, J. F. & Zamir, A. (1973) *Carbohydr. Res.* **29** 497-501.
- Kennedy, J. F. & Zamir, A. (1975) *Carbohydr. Res.* **41** 227-233.
- Kennedy, J. F., Barker, S. A. & Rosevear, A. (1973) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1** 2293-2299.
- Kennedy, J. F., Barker, S. A. & Zamir, A. (1974) *Antimicrob. Agents Chemother.* **6** 777-782.
- Kennedy, J. F., Barker, S. A. & Humphreys, J. D. (1976) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1** 962-967.
- Kennedy, J. F., Barker, S. A. & White, C. A. (1977a) *Carbohydr. Res.* **54** 1-12.
- Kennedy, J. F., Barker, S. A. & White, C. A. (1977b) *Stärke* **29** 240-243.
- Kennedy, J. F., Barker, S. A. & Pike, V. W. (1977c) *Biochim. Biophys. Acta* **484** 115-126.
- Kennedy, J. F., Pike, V. W. and Barker, S. A. (1980a) *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 126-132.
- Kennedy, J. F., Barker, S. A. & Kay, I. M. (1980b) *Carbohydr. Res.* **80** 25-36.
- Kennedy, J. F., Humphreys, J. D. & Barker, S. A. (1981) *Enzyme Microb. Technol.* **3** 129-136.
- Kitajima, M., Miyano, S. & Kondo, A. (1969) *Kogyo Kagaku Zasshi* **72** 493-499.
- Kitano, H., Yoshijima, S. & Ise, N. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 2643-2653.
- Kjellén, K. G. & Neujahr, H. Y. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 715-719.
- Kjellén, K. G. & Neujahr, H. Y. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 299-310.
- Klei, H. E., Surdstrom, D. W. & Gargano, R. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 611-617.
- Klemes, J. & Citri, N. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 897-905.
- Klinov, S. V., Sugrbova, N. P. & Kurganov, B. T. (1979) *Molek. Biol.* **13** 559-566.
- Klyosov, A. A. & Gerasimas, V. B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **571** 162-165.
- Kobayashi, T., Kato, I., Ohmiya, K. & Shimizu, S. (1980) *Agric. Biol. Chem.* **44** 413-418.
- Konecny, J. & Sieber, M. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 2013-2029.
- Kozlova, N. B., Roze, L. V. & Vul'ison, P. L. (1978) *Biochemistry (USSR)* **43** 403-411.
- Krishnaswamy, S. & Kittrel, J. R. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 821-835.
- Kuan, K. N., Lee, Y. Y. & Melius, P. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1725-1734.
- Kucera, J. & Kuminkova, M. (1980) *Collect. Czech. Comm.* **45** 298-306.
- Kumakura, M., Yoshida, M., Asano, M. & Kaetsu, I. (1977) *J. Solid-Phase Biochem.* **2** 279-288.
- Lai, T.-S. & Cheng, P.-S. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 773-779.
- Lee, C. Y. (1978) *J. Solid-Phase Biochem.* **3** 71-83.
- Lee, D., Lee, G. K., Reilly, P. J. & Lee, Y. Y. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1-17.

- Legoy, M. D., Garde, V. L., Le Moulic, J. M., Ergon, F. & Thomas, D. (1980) *Biochimie* **62** 341-345.
- Leuba, J. L. & Widmer, F. (1979) *J. Solid-Phase Biochem.* **2** 257-271.
- Lilly, M. D., Kay, G., Sharp, A. K. & Wilson, R. J. H. (1968) *Biochem. J.* **107** 5P.
- Lipatova, T. E., Konoplytskaya, O. L., Chupina, L. N. & Vasylychenko, D. V. (1979) *Ukr. Biochem. Zh.* **51** 319-323.
- Ludolph, R. A., Vieth, W. R., Venkatsubramanian, K. & Constantinides, A. (1979) *J. Molec. Cat.* **5** 197-223.
- Maeda, H. & Suzuki, H. (1972) *Agric. Biol. Chem.* **36** 1581-1593.
- Maeda, H., Tsao, G. T. & Chen, L. T. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 383-402.
- Maeda, H., Chen, L. F. & Tsao, G. T. (1979) *J. Ferment. Technol.* **57** 238-243.
- Manecke, G., Pohl, R., Schlunsen, J. & Vogt, H. G. (1978). In: *Enzyme Engineering*, Vol. 4, p 409-412. Ed. by Broun, G., Manecke, G. & Wingard, L. B. Jr., Plenum Press, New York.
- Marconi, W., Cecere, F., Morisi, F., Della Penna, G. & Rappuoli, B. (1973) *J. Antibiot.* **26** 226-232.
- Marconi, W., Gulinielli, S. & Morisi, F. (1974a) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 501-511.
- Marconi, W., Bartoli, F., Cecere, F. & Morisi, F. (1974b) *Agric. Biol. Chem.* **38** 1393-1399.
- Marconi, W., Morisi, F. & Mosti, R. (1975) *Agric. Biol. Chem.* **39** 1323-1324.
- Marfey, P. S. & King, M. V. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **105** 178-183.
- Marshall, J. J. & Rabinowitz, M. L. (1976) *J. Biol. Chem.* **251** 1081-1087.
- Martinek, K., Klibanov, A. M., Goldmacher, V. S. & Berezin, I. V. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **485** 1-12.
- Martinek, K., Mozhaev, V. V. & Berezin, I. V. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **615** 426-435.
- Matsumoto, K., Seijo, H., Karube, I. & Suzuki, S. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1071-1086.
- Mattiasson, B. & Borrebaeck, C. (1978) *FEBS Lett.* **85** 119-123.
- Mattiasson, B., Danielsson, B., Hermansson, C. & Mosbach, K. (1978) *FEBS Lett.* **85** 203-206.
- Means, G. & Feeney, R. E. (1971) *Chemical Modification of Proteins*, Vol. 1, Holden Day, San Francisco.
- Melander, W. & Horvath, C. (1978). In: *Enzyme Engineering*, Vol. 4, p 355-363. Ed. by Broun, G. B., Manecke, G. & Wingard, L. B. Jr., Plenum Press, New York.
- Merrill, A. H. Jr. & McCormick, D. B. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1629-1638.
- Messing, R. A. (1974) *Process Biochem.* **9** (II) 26-28.
- Messing, R. A. (1975). In *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors* p. 63-78. Ed. by Messing, R. A. Academic Press, New York.
- Mikelsone, Z., Mitrofanova, A. N., Poltorak, O. M. & Arens, A. (1979) *Vestn. Mosk. Univ. Ser. 2* **20** 109-113.
- Mitz, M. A. (1956) *Science* **123** 1076-1077.
- Miura, Y., Miyamoto, K., Urabe, H., Tanaka, H. & Yasuda, T. (1979) *J. Ferment. Technol.* **57** 440-444.
- Mogensen, A. D. & Vieth, W. R. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* **15** 467-482.
- Mohan, R. R. & Li, N. N. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 513-523.
- Monsan, P. (1978) *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* **5** 1-11.
- Mori, T., Tosa, T. & Chibata, T. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **321** 653-661.
- Mori, T., Sano, R., Iwasawa, Y., Tosa, T. & Chibata, T. (1976) *J. Solid-Phase Biochem.* **1** 15-26.
- Morikawa, Y., Karube, I., Suzuki, S., Nakano, Y. & Taguchi, T. (1978a) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1143-1152.
- Morikawa, Y., Karube, I. & Suzuki, S. (1978b) *Biochim. Biophys. Acta* **523** 263-267.
- Morisi, F., Pastore, M. & Viglia, A. (1973) *J. Dairy Sci.* **56** 1123-1127.
- Moriyama, S., Kataoka, S., Nakanishi, K., Matsuno, R. & Kamikubo, T. (1980) *Agric. Biol. Chem.* **44** 2737-2739.
- Mosbach, K. & Danielsson, B. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **364** 140-145.
- Mozhaev, V. V., Martinek, K. & Berezin, I. V. (1979) *Mol. Biol.* **13** 73-80.
- Mukherjee, R. N., Bhattacharya, P., Gangopadhyay, T. & Ghosh, B. K. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 543-553.
- Mukherjee, A. & Srere, P. A. (1978) *J. Solid-Phase Biochem.* **3** 85-94.
- Munnecke, D. M. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 2247-2261.
- Negoro, H. (1972) *J. Ferment. Technol.* **50** 136-142.
- Nelson, J. M. & Griffin, E. G. (1916) *J. Amer. Chem. Soc.* **38** 1109-1115.
- Neujahr, H. Y. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 913-918.

- Ng, T. T. & Laidler, K. J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **525** 93-102.
- Ogumttimein, G. B. & Reilly, P. J. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 1127-1142.
- Ohba, R. & Ueda, S. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 2137-2154.
- Ohba, R., Chaen, H., Hayashi, S. & Ueda, S. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 665-676.
- Olson, A. C. & Stanley, W. L. (1979). In: *Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes*, p. 51-62. Ed. by Olson, A. C. & Cooney, C. L., Plenum Press, New York.
- Ono, M. Tosa, T. & Chibata, I. (1978) *Agric. Biol. Chem.* **42** 1847-1853.
- Ooshima, H., Sakimoto, M. & Harano, Y. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 2155-2167.
- Ostergaard, J. C. W. & Martiny, S. C. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* **15** 561-564.
- Paine, M. A. & Carbonell, R. G. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17** 617-619.
- Pardin, M., Bello, C. D., Marani, A., Bartoli, F. & Morisi, F. (1977) *J. Solid-Phase Biochem.* **2** 251-255.
- Parkin, K. & Hultrin, H. O. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 939-953.
- Patton, J. S., Albertson, P. A., Erlanson, C. & Borgstrom, B. (1978) *J. Biol. Chem.* **253** 4195-4202.
- Paul, F., Couler, P. R., Gautheron, D. G. & Engasser, J.-M. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1785-1796.
- Pavanakrishnan, R. & Bose, S. M. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 919-928.
- Pifferi, P. G., Pasquali, C., Tocco, M. G. & Domini Pellerano, I. M. (1980) *Technol. Aliment* **3** 9-14.
- Pittner, F., Miron, T., Pittner, G. & Wilchek, M. (1980) *J. Amer. Chem. Soc.* **102** 2451-2452.
- Quioko, F. A. & Richards, F. M. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **52** 833-839.
- Quioko, F. A. & Richards, F. M. (1966) *Biochemistry* **5** 4062-4076.
- Remy, M.-H., David, A. & Thomas, D. (1978) *FEBS Lett.* **88** 332-336.
- Rexova-Benkova, L., Mrackova, M. & Babor, K. (1980) *Collect. Czech. Chem. Comm.* **45** 163-168.
- Rodinov, Y. V., Avilova, T. V. & Popov, V. O. (1977) *Biochemistry (USSR)* **42** 1594-1598.
- Roger, L., Thapon, J. L., Maubois, J. C. & Brule, G. (1976) *Le Lait* **55** 56-75.
- Rokugawa, K., Fujishima, T., Kuminaka, A. & Yoshino, H. (1979) *J. Ferment. Technol.* **57** 570-573.
- Royer, G. P. & Uy, R. (1973) *J. Biol. Chem.* **248** 2627-2629.
- Sada, E., Katoh, S. & Terashima, M. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 243-246.
- Sada, E., Katoh, S. & Terashima, M. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 1037-1044.
- Sato, T., Mori, T., Tosa, T. & Chibata, I. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **147** 788-796.
- Sato, I., Karube, I. & Suzuki, S. (1977) *J. Solid-Phase Biochem.* **2** 1-7.
- Schiger, H., Teufel, E. H. & Philipp, M. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 55-64.
- Schreiner, H. R. (1966), U.S. Patent, 3, 282, 702.
- Shemer, L., Granot, R., Freeman, A., Sokolovsky, M. & Goldstein, L. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1607-1627.
- Shimizu, S. Y. & Lenhoff, H. M. (1979) *J. Solid-Phase Biochem.* **4** 75-94.
- Silman, R. W., Black, L. T., McGhee, J. E. & Bagley, E. B. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 533-541.
- Snamprogetti, S. P. A. (1976), U.S. Patent, 3, 969, 990.
- Sodini, G., Baroncelli, V., Canella, M. & Renzi, P. (1974) *Italian J. Biochem.* **23** 121-135.
- Solomon, B. & Levin, Y. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 1161-1177.
- Spotelli, P., Botlacin, A. & Zamorani, A. (1980) *Technol. Aliment* **3** 31-34.
- Srere, P. A. & Uyeda, K. (1976). In: *Methods in Enzymology*, Vol. 44, p. 11-19. Ed. by Mosbach, K., Academic Press, New York.
- Stambolieva, N. & Turkova, J. (1980) *Collect. Czech. Chem. Comm.* **45** 1137-1143.
- Stanley, W. L., Watters, G. G., Kelly, S. H. & Olson, A. C. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 135-140.
- Sud'ina, E. G. & Golod, M. G. (1979) *Ukr. Biokhim. Zh.* **51** 400-403.
- Sud'ina, E. G., Smartsev, M. A., Golod, M. G. & Dovbysh, E. V. (1979) *Ukr. Biokhim. Zh.* **51** 404-408.
- Sundaram, P. V. (1979) *Biochem. J.* **179** 445-447.
- Sundaram, P. V. & Joy, K. (1978) *J. Solid-Phase Biochem.* **3** 223-240.
- Sundaram, P. V., Igloi, M. P., Wassermann, R. & Hinsch, W. (1978) *Clin. Chem.* **24** 1813-1817.
- Sundaram, P. V., Blumenberg, B. & Himsh, W. (1979) *Clin. Chem.* **25** 1436-1439.
- Svec, F., Kálal, J., Menyailova, I. I. & Nakhapetyan, L. A. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1319-1328.
- Szewczuk, A., Ziomek, E., Mordarski, M., Siewiński, M. & Wieczorek, J. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 1543-1552.

- Szwajcer, E., Szewczuk, A. & Mordarski, M. (1981) *Biotechnol. Bioeng.* 23 1675-1681.
- Tashiro, Y. & Matsuda, T. (1978) Japan, Pat. Kokai 78-32191.
- Torchilin, V. P., Galka, M. & Ostrowski, W. (1977a) *Biochim. Biophys. Acta* 483 331-336.
- Torchilin, V. P., Tischenko, E. G. & Smirnov, V. N. (1977b) *J. Solid-Phase Biochem.* 2 19-29.
- Tosa, T., Mori, T., Fuse, N. & Chibata, I. (1966) *Enzymologia* 31 214-225.
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takata, I., Nishida, Y. & Chibata, I. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* 21 1697-1709.
- Tramper, J., Miller, F., Henk, C. & van der Plas, H. C. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* 20 1507-1522.
- Tramper, J., Angelino, S. A. G. F., Müller, F. & van der Plas, H. C. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* 21 1767-1786.
- Ugarova, N. N., Brovko, L. Y., Rozhkova, G. D. & Berezin, I. V. (1977) *Biochemistry (USSR)*, 42 943-949.
- Udpike, S. J. & Hicks, G. P. (1967) *Nature* 214 986-988.
- Vallin, D. & Tran-Minh, C. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 571 321-332.
- Van Etten, R. L. & Saini, M. S. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 484 487-492.
- Vegarud, G. & Christensen, T. B. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* 17 1391-1397.
- Voivodov, K. I., Galunski, B. R. & Dyankov, S. S. (1979) *J. Appl. Biochem.* 1 442-445.
- Volkova, A. N., Ivanova, L. V., Matveenko, A. P., Yakovlev, V. I. & Kol'tsov, S. I. (1979) *Khim. Khim. Tekhnol.* 22 844-847.
- Wadiak, D. T. & Carbonell, R. G. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 17 1157-1181.
- Wandrey, C., Flaschel, E. & Schügerl, K. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* 21 1649-1670.
- Wassermann, B. D., Hultrén, H. O. & Jacobson, B. S. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 22 271-287.
- Watanabe, T., Mori, T., Tosa, T. & Chibata, I. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* 21 477-486.
- Weetall, H. H. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 212 1-7.
- Wingard, L. B. Jr., Katchalski-Katzir, E. & Goldstein, L. (1976) *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 1, Academic Press, New York.
- Wiseman, A. (1978) *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* Vol. 2, Ellis Horwood, Chichester.
- Woodward, J. & Wiseman, A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 527 8-16.
- Wykes, I. R., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 250 522-529.
- Yamada, H. (1978) *J. Biochem. (Tokyo)* 83 1577-1581.
- Yarovaya, G. A., Gulynskaya, T. N., Dotsenko, V. L., Bessmertnaya, L. Ya., Kozlov, L. V. & Antonov, V. K. (1975) *Biorg. Khim.* 1 646-651.
- Yeung, K.-K., Owen, A. J. & Dain, J. A. (1979) *Carbohydr. Res.* 75 295-304.
- Zaborsky, O. R. (1973) *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Cleveland.
- Zaffaroni, P., Oddo, N., Olivieri, R. & Formiconi, L. (1975) *Agric. Biol. Chem* 39 1875-1877.
- Zingaro, R. A. & Uziel, M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 213 371-379.

第 5 章

- Avrameas, S. (1969) *Immunochemistry* 6 43-52.
- Avrameas, S. & Ternynck, T. (1971) *Immunochemistry* 8 1175-1179.
- Bandi, Z. L., Fuller, J. B., Bee, D. E. & James, G. P. (1981) *Clin. Chem.* 27 27-34.
- Barker, S. A. & Kay, I. (1975) In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*, pp. 89-110, (Ed. by Wiseman, A.) Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- Bergmeyer, H. U. (ed.) (1974) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 1-4, 2nd ed. Academic Press, New York.
- Bergmeyer, H. U. (ed.) (1978) *Principles of Enzymatic Analysis*, Verlag-Chemie, New York.
- Bergmeyer, H. U. (ed.) (1983 et seq.) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 1-10, 3rd ed. Academic Press, New York.
- Blake, C., Al-Bassam, M. N., Gould, B. J., Marks, V., Bridges, J. W. & Riley, C. (1982) *Clin. Chem.* 28 1469-1473.
- Blake, C. & Gould, B. J. (1984) *The Analyst* 109 533-547.
- Bowers, L. D. (1982) *Trends Anal. Chem.* 1 191-198.
- Burd, J. F., Carrico, R. J., Tetter, M. C., Buckler, R. T., Johnson, R. D., Boguslaski, R. C. & Christner, J. E. (1977) *Anal. Biochem.* 77 56-67.

- Campbell, J. & Hornby, W. E. (1977). In: *Biomedical Applications of Immobilised Enzymes and Proteins*, pp. 3-26 (ed. by Chang, T. M. S.). Plenum Press, New York.
- Carlier, Y., Bout, D. & Capron, A. (1981) *Bulletin De l'Institut Pasteur* 79 313-382.
- Carr, P. W. & Bowers, L. D. (1980) *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*, John Wiley and Sons, New York.
- Cate J. C., Hedrick, R., Taylor, M. & McGlothlin, C. D. (1980) *Clin. Chem.* 26 266-270.
- Chirillo, K., Caenaro, G. Paven, B. & Pin, A. (1979) *Clin. Chem.* 25 1744-1748.
- Chua, K. S. & Tan, I. K. (1978) *Clin. Chem.* 24 150-152.
- Clark, P. M. S. & Broughton, P. M. G. (1983a) *J. Autom. Chem.* 5 22-26.
- Clark, P. M. S. & Broughton, P. M. G. (1983b) *Ann. Clin. Biochem.* 20 208-212.
- Colliiss, J. S. & Knox, J. M. (1978) *Med. Lab. Sci* 34 275-285.
- Curme, H. G., Columbus, R. L., Dappen, G. M., Eder, T. W., Fellows, W. D., Figueras, J., Glover, C. P., Goffe, C. A., Hill, D. E., Lawton, W. H., Muka, E. J., Pinney, J. E., Rand, R. N., Sanford, K. J. & Wu, T. W. (1978) *Clin. Chem.* 24 1335-1342.
- Curtius, H. Ch. & Roth, M. (1974) *Clinical Biochemistry*, Vol. 2, pp. 1186-1304, Walter de Gruyter, Berlin and New York.
- Dappen, G. M., Cumbo, P. E., Goodhue, C. T., Lynn, S. Y., Morganson, C. C., Nellis, B. F., Sablauskas, D. M., Schaeffer, J. R., Schubert, R. M., Snoke, R. E., Underwood, G. M., Warburton, C. D. & Wu, T. W. (1982) *Clin. Chem.* 28 1159-1162.
- Drucker, R. F., Williams, D. R. R. & Price, C. P. (1983) *J. Clin. Pathol.* 36 948-953.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971) *Immunochemistry* 8 871-874.
- Erlanger, B. F., Borek, G., Beiser, S. M. & Lieberman, S. (1959) *J. Biol. Chem.* 234 1090-1094.
- Filippusson, H., Hornby, W. E. & McDonald, A. (1972) *FEBS Lett.* 20 291-293.
- Finley, P. R., Williams, R. J. & Lichti, D. A. (1980) *Clin. Chem.* 26 1723-1726.
- Free, A. H. (1977) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 7 479-485.
- Free, A. H., Adams, E. C., Kercher, M. L., Free, H. M. & Cook, M. H. (1957) *Clin. Chem.* 3 163-168.
- Gould, B. J. (1975) In: *Handbook of Enzyme Biotechnology*, pp. 5-26 (ed. by Wiseman, A.) Ellis Horwood Ltd, Chichester.
- Gould, B. J. (1978) *U.V. Spectrometry Group Bulletin* 6 57-68.
- Gray, D. N., Keyes, M. H. & Watson, B. (1977) *Anal. Chem.* 49 1067A-1075A.
- Greyson, J. (1981) *J. Autom. Chem.* 3 66-71.
- Guilbault, G. G. (1976) *Handbook of Enzymatic Methods of Analysis*, Marcel Dekker, New York.
- Gupta, R. C., Goyal, A. & Singh, P. P. (1982) *Clin. Chem.* 28 1724.
- Hall, P. M. & Cook, J. G. H. (1982) *Clin. Chem.* 28 387-388.
- Hamilton, S. D. & Pardue, H. L. (1982) *Clin. Chem.* 28 2359-2365.
- Hornby, W. E., Inman, D. J. & McDonald, A. (1972) *FEBS Lett.* 20 114-116.
- Hornby, W. E. & Morris, D. (1975) In: *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides*, pp. 142-169 (ed. by Weetall, H.), Marcel Dekker Inc., New York.
- Horvath, C. & Solomon, B. A. (1972) *Biotech. Bioeng.* 14 885-914.
- IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) (1977) *Clin. Chem. Acta* 80 F21-22.
- Ishikawa, E. (1980) *Immunoassay* (Suppl. 1), 1-16.
- Kato, K., Hamaguchi, Y., Fukui, H. & Ishikawa, E. (1975) *J. Biochem.* 78 235-237.
- Kay, J. D. S. & Taylor, F. (1983) *Clin. Chem.* 29 1558-1559.
- King, G., Steggle, D. & Harrop, J. S. (1982) *Br. Med. J.* 285 1165.
- Koch, T. R. & Nipper, H. C. (1977) *Clin. Chim. Acta* 78 315-322.
- Kutter, D. (1977) *Rapid Clinical Diagnostic Tests*, Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- Landon, J., Carney, J. & Langley, D. (1977) *Ann. Clin. Biochem.* 14 90-99.
- Leon, P. L., Sansur, M., Snyder, L. R. & Horvath, C. (1977) *Clin. Chem.* 23 1556-1562.
- Leon, P. L., Smith, J. B., Yeung, A. & Yeh, C. K. (1982) *J. Autom. Chem.* 4 11-16.
- Lindh, M., Lindgren, K., Carlström, A. & Masson, P. (1982) *Clin. Chem.* 28 726.
- McComb, R. B., Bond, L. W., Burnett, R. W., Keech, R. C. & Bowers, G. N. (1976) *Clin. Chem.* 22 141-150.
- Miller, J. N., Rocks, B. F. & Thorburn Burns, D. (1976) *Anal. Chim. Acta* 86 93-101.
- Miller, J. N., Rocks, B. F. & Thorburn Burns, D. (1977) *Anal. Chim. Acta* 93 353-356.
- Mitsuma, T., Colucci, J., Shenkman, L. & Hollander, G. S. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46 2107-2113.
- Möllerling, H., Wahlefeld, A. W. & Michal, G. (1978) In: *Principles of Enzymatic Analysis*, pp. 89-93, (ed. by Bergmeyer, H. U.), Verlag Chemie, Weinheim.
- Moody, G. J. & Thomas, J. D. R. (1975) *Analyst* 100 609-619.
- Mottola, H. A. (1983) *Anal. Chim. Acta* 145 27-39.
- Nakane, P. K. & Kawaoi, A. (1974) *J. Histochem. Cytochem.* 22 1084-1091.

- Ngo, T. T. (1980) *Int. J. Biochem.* **11** 459-465.
- Olesen, H., Mortensen, H. & Mølsted-Pedersen, L. (1983) *Clin. Chem.* **29** 212.
- O'Sullivan, M. J., Bridges, J. W. & Marks, V. (1979) *Ann. Clin. Biochem.* **16** 221-239.
- O'Sullivan, M. J., Gremmi, E., Morris, D., Al-Bassam, M. N., Simmons, M., Bridges, J. W. & Marks, V. (1978a) In: *Enzyme-linked Immunoassay of Hormones and Drugs*, pp. 301-310, (ed. by Pal, S. P.), Walter de Gruyter, Berlin and New York.
- O'Sullivan, M. J., Gnemmi, E., Morris, D., Chierigatti, G., Simmons, M., Simmonds, A. D., Bridges, J. W. & Marks, V. (1978b) *FEBS Lett* **95** 311-313.
- Purdue, H. L. (1977) *Clin. Chem.* **23** 2189-2201.
- Rocks, B. F. (1973) *Proc. Soc. Anal. Chem.* **10** 164-165.
- Roth, M. & Selz, L. (1980) In: *Trends in Enzymology, FEBS*, Vol. 61, pp. 145-153, (ed. by Vitale, Lj. & Simeon, V.) Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris and Frankfurt.
- Rowley, G. L., Rubenstein, K. E., Huisjen, J. & Ullman, E. F. (1975) *J. Biol. Chem.* **250** 3759-3766.
- Sampson, E. J. & Baird, M. A. (1979) *Clin. Chem.* **28** 1721-1729.
- Schuurs, A. H. W. M. & Van Weeman, B. K. (1977) *Clin. Chem. Acta* **81** 1-40.
- Sherwood, J. M., Warchal, M. E. & Chen, S. (1983) *Clin. Chem.* **29** 438-446.
- Shirey, T. L. (1983) *Clin. Biochem.* **16** 147-155.
- Simpson, E. & Thompson, D. (1977) *Lancet* **ii** 361-362.
- Simpson, E. & Thompson, D. (1978) *Clin. Chem.* **24** 389-390.
- Smith, C. H., Landt, M., Steelman, M. & Ladenson, J. H. (1983) *Clin. Chem.* **29** 1422-1425.
- Sokol, L., Garber, C., Shults, M. & Updike, S. (1980) *Clin. Chem.* **26** 89-92.
- Spayd, R. W., Bruschi, B., Burdick, B. A., Dappen, G. M., Eikenberry, J. N., Esders, T. W., Figueras, J., Goodhue, C. T., LaRossa, D. D., Nelson, R. W., Rand, R. N. & Wu, T. W. (1978) *Clin. Chem.* **24** 1343-1350.
- Spencer, W. W., Sylvester, D. & Nelson, G. H. (1978) *Clin. Chem.* **24** 386-387.
- Stevens, J. F. & Newall, R. G. (1983a) *J. Clin. Pathol.* **36** 9-13.
- Stevens, J. F., Tsang, W. & Newall, R. G. (1983b) *J. Clin. Pathol.* **36** 598-601.
- Stewart, T. C. & Kleyale, R. M. (1983) *Clin. Chem.* **29** 132-135.
- Sundaram, P. V. & Hornby, W. E. (1970) *FEBS Lett.* **10** 325-327.
- Sundberg, M. W., Becker, R. W., Esdero, T. W., Figueras, J. & Goodhue, C. T. (1983) *Clin. Chem.* **29** 645-649.
- Tateishi, K., Yamamoto, H., Ogihara, T. & Hayashi, C. (1977) *Steroids* **30** 25-32.
- Thomas, L., Plischke, W. & Storz, G. (1982) *Ann. Clin. Biochem.* **19** 214-223.
- Toffaletti, J., Blosser, N., Hall, T., Smith, S. & Tompkins, D. (1983) *Clin. Chem.* **29** 684-687.
- Tomkin, G. H. & Moore, J. (1977) *J. Irish Med. Ass.* **70** 490-493.
- Ullman, E. F., Yoshida, R. A., Blakemore, J. L., Maggio, E. & Leute, R. (1979) *Biochem. Biophys. Acta* **567** 66-74.
- Walter, B. (1983) *Anal. Chem.* **55** 498A-514A.
- Werner, M., Mohrbacher, R. J., Riendeau, C. J., Murador, E. & Cambiaghi, S. (1979) *Clin. Chem.* **25** 20-23.
- Wisdom, G. B. (1976) *Clin. Chem.* **22** 1243-1255.
- Yolken, R. H. (1982) *Rev. Infectious Diseases* **4** 35-68.

Zeigonhorn, J., Senn, M. & Bücher, T. (1976) *Clin. Chem.* **22** 151-160.

Zipp, A. (1981) *J. Autom. Chem.* **3** 71-75.

B 部分 第2章

- Baird, J. K., Sherwood, R. F., Carr, R. J. G. & Atkinson, A. (1976) *FEBS Lett* **70** 61-66.
- Bell, D. J., Hoare, M. & Dunnill, P. (1983) *Advances Biochem. Eng.* **26** 1-72.
- Butters, J. R. (1969) *Process Biochem.* **5** 25-27.
- Callow, D. S., Atkinson, A. & Melling, J. (1973) *FEBS Abs.* No. 54, Dublin.
- Charm, S. E. & Matteo, C. C. (1971) *Methods Enzymol.* **22** 476-556.
- Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1972) In *Enzyme Engineering*, pp. 101-113 ed. by L. B. Wingard, Wiley, New York.
- Elsworth, R., Meakin, L. R. P., Pirt, S. J. & Capel, G. H. (1956) *J. Appl. Bact.* **19** 264-278.
- Fischer, L. (1969) In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 1,

- pp. 151-396, ed. by T. S. Work & E. Work. North Holland Publishing Co., Amsterdam and London.
- Gold, A. M. (1965) *Biochemistry* (Washington) 4 897-901.
- Hammond, P. M., Price, C. P. & Scawen, M. D. (1983) *Eur. J. Biochem.* 132 651-655.
- Hedenskog, G., Enebo, L., Vendlova, J. & Prokes, B. (1969) *Biotech. Bioeng.* XI 37-51.
- Hill, E. A. & Hirstenstein, M. D. (1983) In: *Advances in Biotechnological Processes* pp. 31-66. A. Mirzahi & A. VanWeszel, eds. Alan R. Liss, Inc., New York.
- James, G. T. (1978) *Anal. Biochem.* 86 574-579.
- Janson, J. C. (1984) *Trends Biotechnol.* 2 1-8.
- Janson, J. C. & Hedman, P. (1982) *Adv. Biochem. Eng.* 25 43-99.
- Le, M. S., Spark, L. B. & Ward, P. S. (1984a) *J. Membrane Sci.* (in press).
- Le, M. S., Spark, L. B., Ward, P. S. & Ladwa, N. (1984b) *J. Membrane Sci.* (in press).
- Lingood, F. V., Matthews, A. C., Pinfield, S., Pope, C. G. & Sharland, T. R. (1955) *Nature* 176 1128.
- Linko, M., Wallinder, P. & Linko, Yu-Yen (1973) *FEBS Abs.* No. 59, Dublin.
- Melling, J., Evans, C. G. T., Harris-Smith, R. & Stratton, J. E. D. (1973) *J. Gen. Microbiol.* 77 xviii.
- Melling, J. & Scott, G. K. (1972) *Biochem. J.* 130 55-62.
- Petersen, E. A. (1970) In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 2, pp. 223-396, ed. by T. S. Work & E. Work. North Holland Publishing Co., Amsterdam and London.
- Quirk, A. V. & Woodrow, J. R. (1983) *Biotechnol. Letts.* 5 277-282.
- Rahacek, J., Beran, K. & Bicik, V. (1969) *Appl. Microbiol.* 17 462-466.
- Solomons, G. L. (1969) *Materials and Methods in Fermentation*, Academic Press, London.
- Tanny, G. B., Mirelman, D. & Pistole, T. (1980) *Appl. Environmental Microbiol.* 40 269-273.
- Thurston, C. F. (1972) *Process Biochem.* 8 18-20.
- Valeri, A., Gazzei, G. & Genna, G. (1979) *Experientia* 35 1535-1536.
- Woodrow, J. R. & Quirk, A. V. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* 4 385-389.

第3章

- Abbott, B. J. (1976) *Adv. Appl. Microbiol.* 20 (ed. Perlman, D.) Academic Press, 203-257.
- Abbott, B. J. & Berry, D. R. (1982) US Patent 4,316,955 assigned to Eli Lilly & Co.
- Ahronowitz, Y. & Cohen, G. (1981) *Sci. Amer.* 245 141-152.
- Allen, D. H. (1980) *Economic Evaluation of Projects*, Inst. Chem. Engs.
- Amotz, S., Nielsen, T. K. & Thiesen, N. O. (1976), U.S. Patent 3,980,521 assigned to Novo Ind., A/S, Denmark.
- Anderson, D. M., Hsiao, H.-Y., Somerville, R. L. & Herrmann, K. M. (1984) UK Pat. Applic. GB 2 130 216 A.
- Archer, M. C., Colton, C. K., Cooney, C. L., Demain, A. L., Wang, D. I. C. & Whitesides, G. M. (1975). In: *Enzyme Technol. Grantees - Users Conf.* (Ed. Pyc, E. K.), pp. 1-8. Natl. Sci. Found. (USA).
- Arima, K., Yu, J., Iwasaka, S. & Tamara, G. (1966) *Appl. Microbiol.* 16 1727.
- Asai, Y., Shimada, M. & Soda, K. (1982), U.S. Patent 4,335,209, assigned to the Mitsui Toatsu Chemicals Inc.
- Atkinson, A., Bruton, C. J., Comer, M. J. & Sharp, R. J. (1982) US Patent 4,342,827.
- Atkinson, T. (1983) *Phil. Trans. Royal Soc. B* 300 399-410.
- Atkinson, A., Hammond, P. M., Price, C. P. & Scawen, M. D. (1980), U.K. Patent Applic. No. 8038634.
- Aunstrup, K. (1976), U.S. Patent 3,988,207 assigned to Novo Terapeutisk Lab. A/S, Denmark.
- Aunstrup, K. (1977) In: *Biotechnological applications of proteins and enzymes* (Eds. Bohak, Z. & Sharon, N.) Academic Press, pp. 39-49.
- Ball, C., Lawrence, A. J., Butler, J. M. & Morrison, K. B. (1978) *Eur. J. Appl. Micro. & Biotechnol.* 5 95-102.
- Barfoed, H. L. (1981) in *Essays in Appl. Microb.* (ed. Norris, J. R. & Richmond, M. N.) J. Wiley Ltd.
- Barker, S. A., Somers, P. J., Epton, R. & McLaren, J. V. (1970) *Carbonyl. Res.* 14 287-296.

- Bauer, D. P. (1981) US Patent 4,262,092.
- Beck, C. I. & Scott, D. (1974) In: *Food related enzymes*. (Ed. J. R. Whitaker). *Adv. in Chem. Series No. 136*, pp. 1-30, Am. Chem. Soc.
- Becker, W. & Pfeil, E. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.* 88 4299-4300.
- Bellet, P. & van Thuong, T. (1969), U.S. Patent 3, 432, 393.
- Bergmeyer, H.-U. (1953) *Biochem. Z.* 324 408-432.
- Berry, E. K. M., Allison, N. & Skinner, A. J. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 110 39-45.
- Betz, J. C., Brown, P. R., Smyth, M. J. & Clark, P. H. (1974) *Nature* 247 261-264.
- Boyer, E. W. & Ingle, M. B. (1977), U.S. Patent 4,061,541, assigned to Miles Labs. Inc. USA.
- Branner-Jorgensen, S. US Patent 4,386,160.
- de Bont, J. A. M., Tramper, J. & Luyten, K. Ch. A. M. (1981) *Abs. Commun.* 2nd Eur. Cong. Biotechnol. S.C.I. pp. 158.
- Brodelius, P. (1978) *Adv. Biochem. Eng.* 10 75-130.
- Bruton, C. J. (1983) *Phil. Trans. Royal Soc. B* 300 249-260.
- Bucke, C. (1983) In: *Microb. Enz. in Biotechnol* (Ed. Fogarty, W. M.) *Appl. Sci.*, pp. 93-129.
- Bucke, C. (1977) In: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* (Ed. Wiseman, A.), Ellis Horwood, pp. 147-168.
- Bucke, C. & Wiseman, A. (1981) *Chem. and Ind.* 7 234-240.
- Buckland, B. C., Richmond, W., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1974) In: *Industrial aspects of Biochemistry* (Ed. Spencer, B.) *FEBS* pp. 65-79.
- Bull, A. T., Holt, G. & Lilly, M. D. (1982) *Biotechnol. Int. Trends and Perspectives*, OECD.
- Chaiken, I. M., Komoriya, A., Ohno, M. & Widmer, F. (1982) *Appl. Biochem. & Biotechnol.* 7 385-399.
- Chandler, V. V. & Nicol, K. J. (1975) *CSIRO Food Res. Q.* 35 79-88.
- Charney, W. & Herzog, H. L. (1967) *Microbial Trans. of Steroids*, Academic Press; 728 pp.
- Cheetham, P. S. J. (1979) *Anal. Biochem.* 92 447-452.
- Cheetham, P. S. J., Imber, C. E. & Isherwood, J. (1982) *Nature* 299, 628-631.
- Cheryan, M., van Wyk, P. J., Olson, N. F. & Richardson (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 17 585-598.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. & Yamamoto, K. (1975) US Patent 3,886,040.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. & Yamamoto, K. (1975). Japanese Patent Kokai 100, 289/75.
- Chibata, I., Tosa, T. & Sato, T. (1976). In: *Methods in Enzymology* (Ed. Mosbach, K.) Academic Press 44, 739-746.
- Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. & Mori, T. (1976). (n: *Methods in Enzymology*. (Ed. Mosbach, K.) 44 Academic Press, pp. 746-759.
- Chiulii, A. J. & Wegman, E. H. (1974). U.S. Patent 3,821, 364, assigned to Adv. Biofactures Corp, USA.
- Chirikjian, J. G. (1982) US Patent 4,342,833 assigned to Betlesda Res. Labs.
- Christie, A. A., Wood, C., Elsworth, R., Herbert, D. & Sergeant, K. (1974), U.S. Patent 3,843,445, assigned to Sec. State Soc. Services (GB).
- Christie, R. B. (1980) *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* 4 25-83.
- Clarke, L. C. Jr. & Lyons, C. (1962) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 102 29-45.
- Coggan, P. & Sanderson, G. W. (1975), U.K. Patent 1 413 351.
- Clayton, D. W., Jurasek, L., Paice, M. G. & O'Leary, S. (1984) *Proc. Biotech '84*, pp. 623-636.
- Cohen, M. B., Spolter, L., Chang, C. C., MacDonald, N. S., Takahashi, J. & Bobinet, O. D. (1974) *J. Nucl. Med.* 15 1192-1195.
- Daniels, M. J. & Farmer, D. M. (1981). U.K. Patent Applic. GB. 2 070 022 B.
- Darbyshire, J. (1981). In: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* 5 (Ed. Wiseman, A.), pp. 147-183.
- Davino, A. A. (1981) US Patent 4,293,648.
- De Fines, J. (1969). In: *Fermentation Advances* (Ed. Perlman, D.), Academic Press, p. 385.
- Demain, A. L. (1971) *Adv. Biochem. Eng.* 1 113-118.
- Demain, A. L., Kornomi, T., Baldwin, J. E. (1981) US Patent 4,307,192.
- Denburg, J. & Deluca, M. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci* 67 1057-1062.
- Denner, W. H. B. (1983) in *Ind. Enzymol.* (Ed. Godfrey, A. & Reichelt, J.) Macmillan Publishers Ltd. pp. 111-169.
- Deo, Y. M. & Gaucher, G. M. (1983) *Biotechnol. Lett.* 5 125-130.
- Deus, B. & Zenk, M. H. (1982) *Biotechnol. Bioeng.* 24 1965-1974.
- Dubourdieu, D., Villetta, J. C., Desplanques, C. & Ribereau-Gayon, P. (1981) *Connaissance de la Vigne et du vin*.
- Duffy, J. I. (1980) *Chemicals by enzymatic and microbial processes*. Noyes Data Corp.,

New Jersey, USA.

- Dunnill, P. (1981) *Chem and Ind.* April 204-247.
- Eder, U., Sauer, G. & Wiechert, R. (1971) *Angew. Chem. Int. Edn.* **10** 496.
- Engelung, L., Paschke, M. & Sohm, H. (1981) US Patent 4,250,261.
- Emken, E. A. (1978) *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **55** 416-421.
- Enari, T.-M. (1983). In: *Microb. Enzs. and Biotechnol.* Appl. Sci. publishers, pp. 183-223.
- Esders, T. W., Goodhue, C. T. & Schubert, R. M. (1979). U.S. Patent 4,166,763, assigned to Eastman Kodak Co. USA.
- Everse, J., Everse, K. E. & Merrer, L. C. (1981) US Patent 4,305,926.
- Falk, L. C., Clark, D. R., Kalwan, S. M. & Long, T. F. (1976) *Clin. Chem.* **22** 785.
- Fehmerling, G. B. (1970). U.S. Patent 3513071.
- Fogarty, W. M. (1983) in *Microb. Enzs. & Biotechnol.* Appl. Sci. Pub. pp. 1-92.
- Fogarty, W. M. & Kelly, C. T. (1983) *ibid*, pp. 131-182.
- Fritz, H., Gebhardt, M., Fink, E., Schramm, W. & Werle, E. (1969) *H.S.Z. Physiol. Chem.* **350** 129-138.
- Fritz, H., Gebhardt, M. & Meister, R. (1970) *H.S.Z. Physiol. Chem.* **351** 571-574.
- Fukui, S., Ikeda, S., Fujimura, M., Yamada, H. & Kumagai, H. (1975) *Eur. J. Biochem.* **51** 155-164.
- Fuji, T., Hanamitsu, K., Izumi, R. & Watanabe, T. (1973) Jap. Kokai 73,99393.
- Fuji, T., Matsamoto, K. & Watanabe, T. (1976) *Proc. Biochem.* **11**(8), 21.
- Gassen, H. G. & Nolte, R. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Common.* **44** 1410-1415.
- Galbraith, W. (1981) US Patent 4,286,064.
- Gerisch, G. (1974). U.S. Patent 3,810,822. Assigned to Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., Germany.
- Gestrelus, J. M. & Kjaer, J. H. (1983). U.S. Patent 4,380,552.
- Givol, D., Weinstein, Y., Gorecki, M. & Wilchek, M. (1970). *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **38** 825-830.
- Godfrey, A. & Reschelt, J. (1983) *Ind. Enzymol.* Macmillan, London.
- Grabner, R. W. (1975). U.S. Patent 3,897,309 assigned to Merck & Co. Inc. USA.
- Gratzner, H. (1972) *J. Bacteriol.* **111** 443-446.
- Gronow, M. (1984) *Trends in Biol. Sci.* Aug. 336-340.
- Greenstein, J. P. (1954) *Adv. Prot. Chem.* **9** 122-202.
- Gregoriadis, G. (1976). In: *Methods in Enzymology* **44** (Ed. Mosbach, K.) Academic Press 698-708.
- Guilbault, G. G. (1971) *Anal. Chim. Acta.* **56** 285-290.
- Guilbault, G. G. (1980) *Enz. & Microb. Technol.* **2** 258-264.
- Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G. (1970). *J. Amer. Chem. Soc.* **92** 2533-2538.
- Guilbault, G. G. & Nagy, G. (1973) *Anal. Letters* **6** 301-312.
- Guilbault, G. G. & Stokbrow, W. (1975) *Anal. Chem.* **47**, 237.
- Gutcho, S. J. (1974) *Microbial Enzyme Production*, Noyes Data Corp., New Jersey, USA.
- Hackel, U., Klein, J., Megnet, R. & Warner, F. (1975) *Eur. J. Applied Microbiol.* **1** 291-294.
- Hahn, P. A., Hartdegen, F. J. & Espenshade, M. R. (1975). U.S. Patent 3,898,131, assigned to W. R. Grace & Co., USA.
- Hajos, Z. G. & Parrish, D. R. (1974) *J. Org. Chem.* **39** 1615.
- Halpern, M. G. (1981) *Industrial Enzymes from Microbial sources*, Noyes Data Corp. New Jersey, USA.
- Hasegawa, S., Patel, M. N. & Snyder, R. C. (1982) *J. Agri. & Food Chem.* **30** 509-511.
- Hasegawa, S. & Peltou, U. A. (1983) *J. Agric. & Food Chem.* **31** 178-180.
- Haas, L. W. & Bohm, R. M. (1934) US Patents 1,957,333-337.
- Heady, R. E. (1980). U.S. Patent 4,335,207 assigned to CPC International Inc.
- Hicks, G. P. & Updike, S. J. (1966) *Anal. Chem.* **38** 726.
- Higgins, J. J., Lewis, D. J., Daly, W. H., Mosquita, F. G., Dunnill, P. & Lilly, M. D. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 159-182.
- HMSO (1982) *Report on the review of enzyme preparations* by Food Additives and Contaminants Committee of MAFF, HMSO.
- Holfman, C. H., Harris, E., Chodroff, S., Micholson, S., Rothrock, J. W., Peterson, F. & Reuter, W. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41** 710-714.
- Hollo, J., Laszlo, E. & Hoschke, A. (1983) *Starch* **35** 169-175.
- Homanberg, G. A., Komoriya, A. & Chaiken, I. M. (1982) *Biochem.* **21** 3385.
- Horton, R. E. & Swaisgood, H. E. (1976). In: *Methods in Enzymol.* **44** (Ed. Mosbach, K.) Academic Press, pp. 517-526.
- Hou, C. T., Patel, R., Laskin, A. I., Barnabe, N. & Barrist, I. (1983a) *Appl. Environ. Microbiol.* **46** 171-177.
- Hou, C. T., Patel, R., Laskin, A. I., Barnabe, N. & Barrist, I. (1983b) *Appl. Environ. Micro-*

biol. 46 178-184.

- Huang, H. T. & Niemann, C. (1951) *J. Amer. Chem. Soc.* 73 475-476.
- Hung, P. P., Lee, S.-G., Roychoudhury, R., Ratzkin, B. J., Schrenck, W. J. & Chen, M. C. (1983) US Patent 4,370,417.
- Hurst, T. L. (1975). U.S. Patent 3,897,305.
- Isaac, O. (1977) US Patent 4,004,976.
- Imamura, S., Matsumoto, T., Muto, N. & Misobi, H. (1982) US Patent 4,397,323.
- Ishu, S., Kihō, K., Sugiyama, S. & Sugimoto, H. (1980). U.S. Patent 4,200,694 assigned to Kikkoman Shoyu Co. Ltd, Japan.
- Isowa, Y., Ohmori, M., Ichikawa, T., Kurita, M., Sato, M. & Mari, K. (1977) *Bull. Chem. Soc. Japan* 50 2762.
- Isowa, Y., Ohmori, M., Mori, K., Ichikawa, T., Nonaka, Y., Kihara, K., Oyama, K., Satoh, H. & Nishimura, S. (1979). U.S. Patent 4,165,311.
- Jones, J. B. (1980) in *Enz. & Non-Enz. Cat.* (Ed. Dunnill, P. *et al.*) Ellis Horwood Ltd. pp. 55-81).
- Jones, J. B. & Beck, J. F. (1976) *Tech. Chem.* 10 107-401.
- Jowitt, R. (ed.) (1980) *Hygienic Design and Operation of Food Plant.* Ellis Horwood Ltd.
- Kainama, K., Kobayashi, S., Ito, T. & Suzuki, S. (1972) *FEBS Lett.* 26 281-285.
- Kamogashira, T., Kawaguchi, T., Miyazaki, W. & Doi, T. (1972) *Japan Kokai* 72 28190.
- Karube, I., Mitsuda, S. & Suzuki, S. (1979) *Eur. J. Microbiol. & Biotechnol* 7 343-350.
- Kato, T. & Homkoshi, K. (1984) *Biotechnol & Bioengin.* 26, 595-598.
- Kennedy, J. F. & White, C. A. (1979) *Starch* 31 93-99.
- Keyes, M. H. (1980). U.S. Patent 4,194,067 assigned to Technicon Instruments Corp, USA.
- Kikuchi, M., Sakaguchi, K. & Nakano, E. (1974). U.S. Patent 3,796,633 assigned to Kikkoman Shoyu Co. Ltd, Japan.
- Kirk, T. K. & Yang, M. H. (1979) *Biotech. letts.* 1 347-352.
- Klibanov, A. M. & Morris, E. D. (1981) *Enz. Microbiol. Technol.* 3 119-122.
- Knorre, D. G., Melamed, N. U., Starostina, U. K. & Shubina, T. N. (1973) *Biokhima* 38 121-123.
- Koaze, Y., Nakajima, Y., Hidaka, H., Niwa, T., Adachi, K., Yoshida, J., Niida, T., Shomura, T. & Ueda, M. (1975). U.S. Patent 3,868, 464 assigned to Meiji Seika Kaisha Ltd, Japan.
- Komoriya, A., Homanberg, G. A. & Chaiken, I. M. (1980) *Int. J. Peptide Protein Res.* 16 433.
- Kon, S. & Ohlson, A. C. (1973) *J. Food Sci.* 38 215-217.
- Korosi, M. (1976) US Patent 3,982,932.
- Kulp, K. (1975). In: *Enzymes in Food Processing* (Ed. Reed, G.) 2nd edn. Academic Press, pp. 53-122.
- Kusakabe, H., Kodama, K., Midorikawa, Y., Machida, H., Kuninaka, A. & Yoshino, H. (1976). U.S. Patent 3,930,955, assigned to Yamasa Shoyu KK, Japan.
- Laboureur, P. & Villanon, M. (1972). U.S. Patent 3634191.
- Lagerlof, E., Nathorst-Westfelt, L., Ekstrom, B. & Sjoberg, B. (1976). In: *Methods in Enzymol* Ed. Mosbach, K.) 44 Academic Press pp. 759-768.
- Lambert, P. W. & Meers, J. L. (1983) *Phil. Trans. Royal Soc. B* 300 263-281.
- Law, B. A. & Wigmore, A. S. (1982) *J. Soc. Dairy Tech.* 35 75-79.
- Lee, D. D., Lee, Y. Y., Reilly, P. J., Collins, Jr., E. U. & Tsao, G. T. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* 18 253-267.
- Liener, I. E. (1977) In: *Food improvements through chemical and enzymatic modification* (Feeney, R. E. & Whitaker, J. R. eds.), *Adv. in Chem Series* 160 pp. 283-300 Am. Chem. Soc.
- Linden, J. C. (1982) *Enz. & Microb. Technol.* 4 130-136.
- Linko, Y., Saarinen, P. & Linko, M. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 17 153-165.
- Linko, Y.-Y., Kautola, H. & Linko, P. (1981) *Adv. in Biotech.* (ed. Moo-Young, M.), Pergamon Press, 685-690.
- Livernoch, D., Jurasek, L., Desrochers, M. & Veliky, I. A. (1981) *Biotech. letts.* 3 701-706.
- Macrae, A. R. (1983). In: *Microb. Enzs & Biotech. Appl. Sci.* publishers, pp. 225-250.
- Maeda, H. & Tsao, G. T. (1979) *Process Biochem.* July, 2-5.
- Marconi, W., Gulinelli, S. & Morisi, F. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* 16 501-511.
- Marshall, R. O. & Kooi, E. T. (1957) *Science* 125 648-649.
- Mårtensson, K. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* 16 579-591.
- Matsumaga, T., Karube, I. & Suzuki, S. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 22 2607-2615.
- Mattiasson, B., Mosbach, K. & Svenson, A. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* 19 1643-1651.
- Mattiasson, B., Ramstorp, M., Nilsson, I. & Hahn-Hagerdal, B. (1981) *Biotech. letts.* 3 561-566.

- Matiasson, B. & Larsson, M. (1984) *Proc. Biotech.* '84, Online Pubs. pp. 683-691.
- Mauer, A. M. & Simone, J. (1976) *Cancer Treat. Rev.* 3 17-41.
- Maul, S. B., Sinskey, A. J. & Tannenbaum, S. R. (1970) *Nature* 228 181.
- May, S. W. & Padgett, S. R. (1983) *Biotechnology Oct.* 677-686.
- Mazur, R. H., Schlatter, J. M. & Goldkamp, A. H. (1969) *J. Amer. Chem. Soc.* 91 2584.
- Middiehoven, W. J. & Bakker, C. M. (1982) *Eur. J. Appl. Micro. Biotechnol.* 15 214-217.
- Miura, Y., Takamatsa, N. & Miyamoto, K. (1975), Jap. Patent 75148588.
- Miura, Y., Yutani, K. & Izumi, Y. (1977). U.S. Patent 4,101,072 assigned to Tokuyama Soda K.K., Japan.
- Misaki, H., Horiuchi, Y., Maluura, K. & Haroda, S. (1981) US Patent 4,275,161.
- Mollenhauer, H. (1956) *Food Manufacture* 47 (Feb.).
- Monsheimer, R. & Pfeleiderer, E. (1981) US Patent 4,293,647.
- Monti, J. C. & Jost, R. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* 20 1173-1185.
- Moriyama, K., Oka, T. & Tsuzuki, H. (1979) *Nature* 280 5721.
- Morikawa, U., Karube, I. & Suzuki, S. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 21 261-270, and *ibid* (1980) 22 1015-1023.
- Munnecke, D. M. (1977) *Appl. & Envir. Microbiol.* 33 503-507.
- Munnecke, D. M. (1978) *Proc. Biochem.* 13 14-17.
- Nakanishi, T. & Machida, Y. (1981) US Patent 4,245,050.
- Nakanishi, T. & Shigemasa, Y. (1981) US Patent 4,273,874.
- Nakanishi, T. & Machida, Y. (1982) US Patent 4,341,868.
- Neidelman, S. L., Amon, W. F. & Geigert, J. (1979). Eur. Patent Applic. 0 007 176.
- Neidelman, S. L. & Geigert, J. (1983) *Trends in Biotechnol.* 1 21-25.
- Nazaly, N. & Knowles, C. J. (1981) *Biotechnol. lett.* 3 363-368.
- Nielsen, M. H. (1980). In: *13th Int. TNO Conf. Rotterdam*, pp. 41-58.
- Nielsen, G. C., Diers, I. V., Outtrup, N. & Norman, B. E. (1982). U.K. Patent Applic. GB 2 097 405 A, assigned to Novo Industri A/S.
- Nielsen, G. C., Diers, V., Outtrup, H. & Norman, B. E. (1982) UK Pat. Applic. GB 2097 405 A.
- Nilsson, I., Ohlson, S., Haggstrom, L., Molin, N. & Mosbach, K. (1980) *Eur. J. Appl. Microbiol. & Biotech.* 10 261-274.
- Nobile, A. W., Charney, P. C., Perlman, H. L., Herzog, C. C., Payne, M. E., Tulley, M. E., Jevnik, M. A. & Hersberg, E. B. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* 77 4184.
- Norman, B. E. (1981). In: *Enzymes and Food Processing* (Ed. Birch, G. G., Blakeborough, N. & Parker, K. J.), Applied Science Publishers pp.15-50.
- Obara, J., Hashimoto, S. & Suzuki, H. (1976/7) *Sugar Technol. Rev.* 4 209.
- Olson, N. F. & Richardson, T. (1974) *J. Food Sci.* 39 653-659.
- Oyama, K., Kihara, K. I. & Nonaka, Y. (1981) *J. Chem. Soc. Perkin* 11 356-360.
- Pastore, M., Morisi, F., Zaccardelli, D. (1974). In: *Immobilized Enzymes* (Eds. Salmons, M., Saronio, C. & Garattini, S.), Raven Press, pp. 211-216.
- Peterson, D. H. & Murray, H. C. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* 74 1871-1872.
- Pfisterer, E. & Wagner, H. (1975) *J. Inst. Brew.* 81 277-280.
- Pilnik, W. & Romboutz, F. M. (1981) in *Enzs. & Food Prod.* Ed. Birch, G. G., Blakeborough, N. & Parker, K. J. Appl. Sci. Pub. pp. 105-128.
- Pitcher, W. H., Ford, J. R. & Weetall, H. H. (1976). In: *Methods in Enzymol.* (Ed. Mosbach, K.) 44 Academic Press 792-809.
- Poulsen, P. B. & Zittion, L. (1976). In: *Methods in Enzymol.* 44 (Ed. Mosbach, K.) Academic Press, 809-821.
- Poulsen, P. B., Rugh, S. & Norman, B. E. (1980). U.S. Patent 4,206,285.
- Prescott, S. C. & Dunn, C. G. (1959) *Industrial Microbiology*. McGraw-Hill.
- Price, C. P. (1983) *Phil. Trans. Royal Soc. B* 300 411-422.
- Priest, F. G. (1983). In: *Microb. Enzs. & Biotechnol.* Appl. Sci. publishers, pp. 319-366.
- Ramaley, R. F. (1979). In: *Advs. in Applied Microbiol.* 25 37-55.
- Reitz, B. & Guilbault, G. G. (1975) *Anal. Chim. Acta* 58 75.
- Robyt, J. F. & Ackerman, R. J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 145 105-114.
- Röder, A., Beaucamp, K., Weimann, G., Schreider, W. & Mühlberger, K. (1976). U.S. Patent 3,951,744, assigned to Boehringer Mannheim GmbH, Germany.
- Röder, A., Möllering, H., Graber, W., Beaucamp, K., Seidel, H., Stahl, P. & Hoerschelmann, D. von (1980). U.S. Patent 4,186,052, assigned to Boehringer Mannheim GmbH, Germany.
- Roland, J. F. (1981) *Enz. & Microbiol. Technol.* 3 105-110.
- Rose, A. H. (1961) *Ind. Microbiol.* Butterworths, pp. 264.
- Rubenstein, K. E., Schneider, R. S. & Ullman, B. F. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 47 846-851.

- Ryu, D. D. Y. & Mandels, M. (1980) *Enz. & Microb. Technol.* 2 91-102.
- Saimaru, H., Izumi, C., Narita, S. & Yamada, M. (1975). Ger. Offen. 2518280.
- Saito, Y., Higachi, M. & Kobayashi, T. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 153 150-187.
- Sakaguichi, K., Uemeru, T. & Kinoshita, S. (1971). In: *Biochemical & Industrial Aspects of Fermentation*, Chapter 4, Kodansha, Tokyo.
- Sakano, Y., Higachi, M. & Kobayashi, S. (1967) *J. Ferm. Tech.* 45 497-503.
- Sato, I., Karube, I. & Suzuki, S. (1976) *Biotech. Bioeng.* 18, 269-272.
- Sato, T., Mori, T., Tosa, T., Chibata, I., Kurui, M., Yamashita, K. & Sumi, A. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 17 1797-1804.
- Scheller, F. W., Schubert, F., Renneberg, R. & Kirstein, D. (1984) *Proc. Biotech. '84* Online Publics. 367-378.
- Scott, D. (1975). In: *Enzymes in Food Processing* (Ed. Reed, G.), 2nd edn., pp. 493-517.
- Sealock, R. W. & Laskowski, Jr. M. (1969) *Biochem.* 8 3703.
- Senn, D. R., Carr, P. W. & Klatt, J. N. (1976) *Anal. Chem.* 48 954-958.
- Shimizu, S., Morioka, H., Tani, Y. & Ogata, K. (1975) *J. Ferm. Technol.* 53 77-83.
- Shinkarenko, L. N., Babenko, J. S. & Grigoriev, E. F. (1976). U.S. Patent 3,963,577.
- Shiosaka, M. (1976). U.S. Patent 3,988,206, assigned to Hayashibara Biochem. Labs. Inc. Japan.
- Sizer, I. W. (1972). *Adv. Appl. Microbiol.* 15 1-11.
- Slater, H. J., Lovatt, D., Weightman, A. J., Senior, E. & Bull, A. T. (1979) *J. Gen. Microbiol.* 114 125-136.
- Snoke, R. E., Risley, H. A. & Goodhue, C. T. (1977). U.S. Patent 4,062,731, assigned to Eastman Kodak Co., USA.
- Steere, N. V. (ed.) (1971) *CRC Handbook of Laboratory Safety* CRC Press.
- Stone, J. V. & Townshend, A. (1973) *J. Chem. Soc.* 5 495-501.
- Senn, D. R., Carr, P. W. & Klatt, J. N. (1976) *Anal. Chem.* 48 954-958.
- Storelli, G., Vogeli, H. & Semenza, G. (1972) *FEBS lett.* 24 287-292.
- Sugiura, M., Shimizu, H., Sugiyama, M., Kuratsu, T. & Hirata, F. (1977). U.S. Patent 4,003,794 assigned to Ono Pharmaceutical Co., Japan.
- Swaigood, H. E. (1977) U.S. Patent 4,053,644.
- Swaigood, H. E. (1978) U.S. Patent 4,087,328.
- Swaigood, H. E. (1980) *Enz. & Microbiol. Technol.* 2 265-272.
- Swaigood, H. E., Horton, R. E. & Mosbach, K. (1976). In: *Methods in Enzymol.* 44 (Ed. Mosbach, K.), pp. 504-516.
- Swann, W. E. (1984) UK Patent Applic. GB 2 127 821 A.
- Szalay, A. A., Mackay, C. J. & Langridge, W. H. R. (1979) *Enz. & Microbiol. Technol.* 1 153-224.
- Takada, N. & Misaki, H. (1982) US Patent 4,357,425.
- Takamatsu, S., Umemura, I., Yamamoto, K., Sato, T., Tosa, T. & Chibata, I. (1982) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15 147-152.
- Takasaki, Y. & Takahara, Y. (1974) *Japan Kokai* 76 70875.
- Takasaki, S., Itoh, M. & Kaneko, Y. (1981) *Eur. J. Appl. Microbiol. & Biotech.* 13 175-178.
- Terada, O. & Uwajima (1977). U.S. Patent 4,011,138 assigned to Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd, Japan.
- Terado, O. & Aisaka, K. (1982) US Patent 4,335,213.
- Terui, G., Okazaki, M. & Kinoshita, S. (1967) *J. Ferm. Tech.* 45 497-503.
- Thompson, J. W., Shovers, J. Sandine, W. E. & Elliker, P.-R. (1970). *Appl. Microbiol.* 19 883-889.
- Thompson, K. N., Johnson, R. A. & Lloyd, N. E. (1974). U.S. Patent 3788945.
- Townshend, A. (1973) *Process Biochem.* 8 22-24.
- van Beynum, G. M. A., Roels, J. A. & van Tilburg, R. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 22 647-649.
- Vandamme, E. J. (1983) *Enz. & Microb. Technol.* 5 403-416.
- Wallerstein, L. (1911). U.S. Patents 995,820 and 995, 823-6.
- Walon, R. (1980). U.S. Patent 4,217,413.
- Wandrey, C., Wichmann, R., Leuchtenberger, W., Kula, M.-R. & Buckmann, A. (1981). U.S. Patent 4,304,858.
- Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., Dunnill, P., Humphrey, A. E. & Lilly, M. D. (1979) *Fermentation and Enzyme Technology*, J. Wiley & Sons.
- Ward, O. P. (1983). In: *Microb. Enzs. & Biotechnol.* Appl. Sci. publishers, 251-317.
- Watanabe, I., Sato, Y. & Takano, T. (1981) US Patent 4,248,968, assigned to the Nitto Chem. Ind. Co.
- Waterburg, J. B., Calloway, C. B. & Turner, R. D. (1983) *Science* 221 1401.
- Weetall, H. H. & Detar, C. C. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* 16 1095-1102.

- Weil, T. A., Dzadzic, P. M., Shih, C.-C. & Price, M. L. (1982) US Patent 4,338,399.
- Whitaker, J. R. (1977). In: *Food Proteins: Improvements through chemical enzymatic modification*. A.C.S. Series 160, pp. 95-155. Am. Chem. Soc.
- Wikström, P., Szajcer, E., Brodelius, P., Nilsson, K. & Mosbach, K. (1982) *Biotech. lett.* **4** 153-158.
- Winter, G., Fersht, A. R., Wilkinson, A. J., Zoller, M. & Smith, M. (1982) *Nature* **299** 756-758.
- Wolf, H. J. (1982) US Patent 4,535,987, assigned to Upjohn Co.
- Wong, C.-H., Gordon, J., Cooney, C. C. & Whitesides, G. M. (1981) *J. Org. Chem.* **46** 4676-4679.
- Wong, C.-H., Haynie, S. C. & Whitesides, G. M. (1982) *J. Org. Chem.* **47** 5418-5420.
- Woodward, J. B. & Bennet, A. B. (1973). U.K. Pat. Spec. 1,421,955.
- Yamada, H., Shimizu, S. & Tani, Y. (1981) US Patent 4,269,942.
- Yamamoto, K., Sato, T., Tosa, T. & Chibata, I. (1974) *Biotechnol. Bioeng.* **16** 1601-1610.
- Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K. & Chibata, I. (1976) *Eur. J. Appl. Microbiol.* **3** 169-183.
- Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K. & Chibata, I. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* **19** 1101-1114.
- Yamashita, M., Arai, S., Kokubo, S., Aso, K. & Fujimaki, M. (1975) *J. Agric. Food Chem.* **23** 27-30.
- Yamashita, M., Arai, S. & Fujimaki, M. (1976) *J. Food Sci.* **41** 1029-1032.
- Yoshimura, Y., Yokogawa, K. & Kawata, S. (1975). U.S. Patent 3,929,579 assigned to Dainippon Pharm. Co. Ltd., Japan.
- Zingard, R. A. & Uziel, M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **213** 371-379.

Additional information on the topics described in these chapters can be found in the following books:

- Industrial Enzymology* (Ed. Godfrey, T. & Reichelt, J.) Macmillan Publishers Ltd. (1983).
- Characterization of Immobilized Biocatalysts* (Ed. Buchholz, K.) DEHEMA monograph vol. 84 (1979).
- Principles of Biotechnology* (Ed. Wiseman, A.) Surrey Univ. Press (1983).
- Methods in Enzymology* (Ed. Mosbach, K.) Academic Press, Vol. 44, (1976).
- Fermentation & Enz. Technol.* (Ed. Wang, D. I. C., et al.,) J. Wiley Ltd. (1979).
- and also in the many journals and series of monographs such as *Biotechnol. Bioengin.* (Wiley Interscience), *Enz. & Microb. Technol.* (IPC Magazines), *Adv. in Biochem. Engin.* (Springer Verlag), *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* (Ellis Horwood Ltd).

第 4 章

- Allen, B. R., Charles, M. & Coughlin, R. W. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 689-706.
- Alm, B. & Nyström, E. (1971) *J. Chromatogr.* **59** 45-52.
- Atkinson, B., Black, G. M., Lewis, P. J. S. & Pinches, A. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 193-200.
- Axén, R., Porath, J. & Ernback, S. (1967) *Nature* **214** 1302-1304.
- Axén, R., Vretblad, P. & Porath, J. (1971) *Acta Chem. Scand.* **25** 1129-1132.
- Barker, S. A., Doss, S. H., Gray, C. J., Kennedy, J. F., Stacey, M. & Yeo, T. H. (1971) *Carbohydr. Res.* **20** 1-7.
- Beddows, C. G., Mirauer, R. A. & Guthrie, J. T. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* **22** 311-321.
- Borlaza, V. C., Cheetham, N. W. H. & Sowthwell-Kelly, P. T. (1980) *Carbohydr. Res.* **79** 125-132.
- Brandenberger, H. (1955) *Angew. Chem.* **67** 661.
- Brandenberger, H. (1956) *Rev. Ferment. Ind. Aliment* **11** 237-241.
- Brandt, J. & Anderson, L.-O. (1976) *Acta Chem. Scand.* **B30** 815-819.
- Brotherton, J. E., Emery, A. & Rodwell, V. W. (1976) *Biotechnol. Bioeng.* **18** 527-543.
- Brown, G. B. (1976) In: *Methods in Enzymology* Vol. 44, p. 263-280. Ed. by Mosbach, K. Academic Press, New York.
- Brown, E. & Racois, A. (1972) *Tetrahedron Lett.* 5077-5080.
- Burge, J., Nicholson-Weller, A. & Austin, K. F. (1981) *Mol. Immunol.* **18** 47-54.
- Burns, R. A. (1976) US Patent 3,953,292.

- Cabral, J. M. S., Novais, J. M. & Cardoso, J. P. (1981a) In: *3rd Internat. Chem. Eng. Symp. Chempor '81*, Porto
- Cabral, J. M. S., Novais, J. M. & Cardoso, J. P. (1981b) *Biotechnol. Bioeng.* **23** 2083-2092.
- Cabral, J. M. S., Kennedy, J. F. & Novais, J. M. (1982a) *Enzyme Microb. Technol.* **4** 337-342.
- Cabral, J. M. S., Kennedy, J. F. & Novais, J. M. (1982b) *Enzyme Microb. Technol.* **4** 343-348.
- Campbell, J. & Chang, T. M. S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **397** 101-109.
- Campbell, J. & Chang, T. M. S. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **69** 562-569.
- Cardoso, J. P., Chaplin, M. F., Emery, A. N., Kennedy, J. F. & Revel-Chion, L. P. (1978) *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **28** 775-785.
- Carlsson, J., Axén, R., Brocklehurst, K. & Crook, E. M. (1974) *Eur. J. Biochem.* **44** 189-194.
- Ceska, M. (1972) *Clin. Chem. Acta* **36** 453-461.
- Chaplin, M. F. & Kennedy, J. F. (1976) *Carbohydr. Res.* **50** 267-274.
- Charles, M., Coughlin, R. W., Parachuri, E. K., Allen, B. R. & Hasselberger, F. X. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* **17** 203-210.
- Cheetham, P. S. J., Imber, C. E. & Isherwood, J. (1982) *Nature* **299** 628-631.
- Chibata, I., Tosa, T. & Sato, T. (1974) *Appl. Microbiol.* **27** 878-885.
- Chiple, J. R. (1974) *Microbios* **10** 115-120.
- Cho, Y. K. & Bailey, J. E. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1651-1665.
- Cho, Y. K. & Bailey, J. E. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* **21** 461-476.
- Conte, A. & Lehmann, K. (1971) *Z. Physiol. Chem.* **352** 533-541.
- Coombe, R. G. & George, A. M. (1982) *Biochemistry* **21** 871-875.
- Coulet, P. R., Godinot, C. & Gautheron, D. C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **391** 272-281.
- Coulet, P. R., Sternberg, R. & Thévenot, D. R. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **612** 317-327.
- Dinelli, D., Marconi, W., Cecere, F., Galli, G. & Morisi, F. (1978) In: *Enzyme Engineering* Vol. 3, p. 477-481. Ed. by Pye, E. K. & Weetall, H. H. Plenum Press, New York.
- D'Souza, S. F. & Nadkarni, G. B. (1980) *Enzyme Microb. Technol.* **2** 217-222.
- Engel, A. M. & Alexander, B. (1971) *J. Biol. Chem.* **246** 1213-1221.
- Epton, R. & Thomas, T. H. (1971) In: *An Introduction to Water Insoluble Enzymes*, Koch-Light Labs Ltd, England.
- Epton, R., McLaren, J. V. & Thomas, T. H. (1972) *Carbohydr. Res.* **22** 301-306.
- Epton, R., Hibbert, B. L. & Marr, G. (1975) *Polymer* **16** 314-320.
- Epton, R., Hobson, M. E. & Marr, G. (1979) *Enzyme Microb. Technol.* **1** 37-40.
- Flynn, A. & Johnson, D. B. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* **20** 1445-1454.
- Gainer, J. L., Kirwan, D. J., Foster, J. A. & Seylan, E. (1981) *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **10** 35-42.
- Glassmeyer, C. K. & Ogle, J. D. (1971) *Biochemistry* **10** 786-792.
- Goldstein, L., Freeman, A. & Sokolovsky, M. (1974) *Biochem. J.* **143** 497-509.
- Grasset, L., Cordier, D. & Ville, A. (1979) *Process Biochem.* **14** 2-5.
- Greenfield, P. F. & Laurence, R. L. (1975) *J. Food Sci.* **40** 906-910.
- Grindbergs, M., Hildebrand, R. P. & Clarke, B. J. (1977) *J. Inst. Brew.* **83** 25-29.
- Hattori, T. & Furusaka, C. (1961) *J. Biochem. (Tokyo)* **50** 312-315.
- Holló, J. To'th, J., Tengerdy, R. P. & Johnson, J. E. (1979) In: *Immobilized Microbial Cells*, p. 73-86. Ed. by Venkatsubramanian, K. ACS Symp. Ser. 106, Washington.
- Holló, J. Weinbrenner, Z., Czako, L. & To'th, J. (1980) *Biotechnol. Lett.* **2** 87-92.
- Jack, T. R. & Zajic, J. E. (1977) *Biotechnol. Bioeng.* **19** 631-648.
- Jagendorf, A. T., Patchornik, A., & Sela, M. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **78** 516-528.
- Jansen, E. F., Togimatsu, Y. & Olson, A. C. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **144** 394-400.
- Jirků, V., Turková, J. & Krumphanzl, V. (1980) *Biotechnol. Lett.* **2** 509-513.
- Kennedy, J. F. (1979) *Chem. Soc. Rev.* **8** 221-257.
- Kennedy, J. F. & Cabral, J. M. S. (1983) In: *Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 4, p. 189-280. Ed. by Wingard, L. B. & Chibata, I. Academic Press, New York.
- Kennedy, J. F. & Chaplin, M. F. (1979) *Enzyme Microb. Technol.* **1** 197-200.
- Kennedy, J. F. & Cho Tun, H. (1973a) *Carbohydr. Res.* **30** 11-19.
- Kennedy, J. F. & Cho Tun, H. (1973b) *Antimicrob. Agents Chemother.* **3** 575-579.
- Kennedy, J. F. & Epton, J. (1973) *Carbohydr. Res.* **27** 11-20.
- Kennedy, J. F. & Humphreys, J. D. (1976) *Antimicrob. Agents Chemother.* **9** 766-770.
- Kennedy, J. F. & Kay, I. M. (1976) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1** 329-335.
- Kennedy, J. F. & Rosevear, A. (1973) *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1** 2041-2046.
- Kennedy, J. F. & White, C. A. (1979) *Stärke* **31** 375-381.
- Kennedy, J. F. & White, C. A. (1983) *Bioactive Carbohydrates: in Chemistry, Biochemistry and Biology*, Ellis Horwood, Chichester.

- Kennedy, J. F. & Zamir, A. (1973) *Carbohydr. Res.* 29 497-501.
 Kennedy, J. F. & Zamir, A. (1975) *Carbohydr. Res.* 41 227-233.
 Kennedy, J. F., Barker, S. A. & Rosevear, A. (1972) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 2568-2573.
 Kennedy, J. F., Epton, J. & Kennedy, G. R. (1973) *Antimicrob. Agents Chemother.* 3 29-32.
 Kennedy, J. F., Barker, S. A. & Humphreys, J. D. (1976) *Nature* 261 242-244.
 Kennedy, J. F., Barker, S. A. & White, C. A. (1977a) *Carbohydr. Res.* 54 1-12.
 Kennedy, J. F., Barker, S. A. & White, C. A. (1977b) *Stärke* 29 240-243.
 Kennedy, J. F., Barnes, J. A. & Matthews, J. B. (1980a) *J. Chromatogr.* 196 379-389.
 Kennedy, J. F., Humphreys, J. D., Barker, S. A. & Greenshields, R. N. (1980b) *Enzyme Microb. Technol.* 2 209-216.
 Kennedy, J. F., Catty, D. & Keep, P. A. (1980c) *Int. J. Biol. Macromol.* 2 137-142.
 Kennedy, J. F., Humphreys, J. D. & Barker, S. A. (1981) *Enzyme Microb. Technol.* 3 129-136.
 Kennedy, J. F., Keep, P. A. & Catty, D. (1982) *J. Immunol. Methods* 50 57-75.
 Kitajima, M., Miyano, S. & Kondo, A. (1969) *Kogyo Kagaku Zasshi* 72 493-499.
 Kohn, J. & Wilchek, M. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* 4 161-163.
 Kopetzki, E. & Entian, K. D. (1982) *Analyt. Biochem.* 121 181-185.
 Krämmer, D. M., Lehman, K., Pennerviss, H. & Plainer, H. (1976) *XXIII Coll. "Part. Biol. Fluids"* 23 505-513.
 Larreta Garde, V., Thomasset, B. & Barbotin, J.-N. (1981) *Enzyme Microb. Technol.* 3 216-218.
 Larsson, R., Olsson, P. & Lindahl, U. (1980) *Thromb. Res.* 19 43-54.
 Lee, C. K. & Long, M. E. (1974) US Patent 3,821,086.
 Lee, J. C., Weith, H. L. & Gilham, P. T. (1970) *Biochemistry* 9 113-118.
 Levin, Y., Pecht, M., Goldstein, L. & Katchalski, E. (1964) *Biochemistry* 3 1905-1913.
 Li, N. N. (1971) *Ind. Eng. Chem. Process Res. Develop.* 10 215-221.
 Linko, Y.-Y., Poutanen, K., Weckeström, L. & Linkö, P. (1979) *Enzyme Microb. Technol.* 1 26-30.
 Long, M. E. (1976) US Patent 3,935,069.
 Maeda, H. & Suzuki, H. (1972) *Agric. Biol. Chem.* 36 1581-1593.
 Maeda, H., Tsao, G. T. & Chen, L. T. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* 20 383-402.
 Manecke, G. & Förster, H. J. (1966) *Makromol. Chem.* 91 136-154.
 Manecke, G. & Gunzel, G. (1967) *Naturwissenschaften* 54 531-533.
 Manecke, G. & Vogt, H. G. (1976) *Makromol. Chem.* 177 725-739.
 Marassy, K. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 659 351-361.
 Messing, R. A. (1974) *Process Biochem.* 9 (11) 26-28.
 Messing, R. A. (1975) US Patent 3,910,851.
 Messing, R. A. (1976). In: *Methods in Enzymology* Vol. 44, p. 148-169. Ed. by Mosbach, K., Academic Press, New York.
 Messing, R. A. & Opperman, R. A. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* 21 49-58.
 Messing, R. A., Oppermann, R. A. & Kolot, F. (1979). In: *Immobilized Microbial Cells*, p. 13-28. Ed. by Venkatsubramanian, K. ACS Symp. Ser. 106, Washington.
 Mitz, M. A. & Summaria, L. J. (1961) *Nature* 189 576-577.
 Monsan, P. & Durand, G. (1971) *C.R. Acad. Sci., Ser. C* 273 33-36.
 Mori, T., Tosa, T. & Chibata, T. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 321 653-661.
 Moo-Young, M., Lamptey, J. & Robinson, C. W. (1980) *Biotechnol. Lett.* 2 541-548.
 Murphy, R. F., Conlon, J. M., Iman, A. & Kelly, G. J. C. (1977) *J. Chromatogr.* 135 427-433.
 Navarro, J. M. & Durand, G. (1977) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 4 243-254.
 Ngian, K. F. & Martin, W. R. B. (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 22 1007-1014.
 Ostergaard, J. C. W. & Martiny, S. C. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* 15 561-564.
 Peine, M. A. & Carbonell, R. G. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 17 617-619.
 Park, Y. H., Chung, T. W. & Moon, H. H. (1980) *Enzyme Microb. Technol.* 2 227-233.
 Paul, F. & Vignais, P. M. (1980) *Enzyme Microb. Technol.* 2 281-287.
 Porath, J., Lás, T. & Janson, J. C. (1975) *J. Chromatogr.* 103 49-62.
 Wilchek, M., Academic Press, New York.
 Porath, J., Laas, T. & Janson, J. C. (1975) *J. Chromatogr.* 103 49-62.
 Richards, F. M. & Knowles, J. R. (1968) *J. Mol. Biol.* 37 231-233.
 Romanov-Skaya, V. A., Karpenko, V. I., Pantskhava, E. S., Grinberg, T. A. & Malashenko, Y. R. (1980) *6th Int. Ferment. Symp. Abstracts* F-12.1.14, p. 123, Ottawa.
 Rouxhet, F. G., Van Haecht, J. L., Didelez, J., Gerard, P. & Briquet, M. (1981) *Enzyme Microb. Technol.* 3 49-54.

- Schovers, J. & Sandine, W. E. (1973) US Patent 3,733,205.
- Shimizu, S. Y. & Lenhoff, H. M. (1979) *J. Solid-Phase Biochem.* 4 75-94.
- Shimizu, S., Moriok, H., Tani, Y. & Ogata, K. (1975) *J. Ferment. Technol.* 53 77-83.
- Slater, E. E. & Strout, H. V. (1981) *J. Biol. Chem.* 256 8164-8171.
- Steup, M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 659 123-131.
- Svec, F., Kádal, J., Menyailova, I. I. & Nakhapetyan, L. A. (1978) *Biotechnol. Bioeng.* 20 1319-1328.
- Szwajcer, E., Brodelius, P. & Mosbach, K. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* 4 409-413.
- Tamura, T., Suzuki, H., Nishimura, Y., Mizoguchi, J. & Hirato, Y. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 4499-4503.
- Thomas, L., Yang, C. H. & Goldthwaite, D. A. (1982) *Biochemistry* 21 1162-1169.
- Tomb, W. H. & Weetall, H. H. (1979) US Patent 3,783,101.
- Torchilin, V. P., Tischenko, E. G. & Smirnov, V. N. (1977) *J. Solid-Phase Biochem.* 2 19-29.
- Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takata, I., Nishida, Y. & Chibata, I. (1979) *Biotechnol. Bioeng.* 21 1697-1709.
- Trevillyan, J. M. & Paul, M. L. (1982) *J. Biol. Chem.* 257 3978-3986.
- Ugi, I. (1962) *Angew. Chem. Int. Ed.* 1 8-21.
- Van Leemputten, E. (1977) US Patent 4,017,364.
- van Velzen, A. G. (1974) US Patent 3,838,007.
- Vieth, W. R. & Venkatasubramanian, K. (1976). In: *Methods in Enzymology*, Vol. 44, pp. 243-263. Ed. by Mosbach, K., Academic Press, New York.
- Vretblad, P. & Axén, P. (1971) *FEBS Letts.* 18 254-256.
- Wagner, A. F., Bugianesi, R. L. & Shen, T. Y. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45 184-189.
- Weakley, F. B. & Mahltretter, C. L. (1973) *Biotechnol. Bioeng.* 15 1189-1192.
- Weetall, H. H. (1976). In: *Methods in Enzymology* Vol. 44, p. 134-148. Ed. by Mosbach, K. Academic Press, New York.
- Weetall, H. H. & Detar, C. C. (1975) *Biotechnol. Bioeng.* 17 295-299.
- White, C. A. & Kennedy, J. F. (1980) *Enzyme Microb. Technol.* 2 82-90.
- Wilchek, M., Oka, T. & Topper, Y. J. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 1055-1058.
- Ziomek, E., Martin, W. G., Veliky, I. A. & Williams, R. E. (1982) *Enzyme Microb. Technol.* 4 405-408.

中科院植物所图书馆



S0011913

来源

89.0
西单转

书价

12.40

单据号

143730

开票日期

89.8.21.

25058

58.17435

247

西海生物技术手册

借者	还期	借者	还期
----	----	----	----

果	1989.8.28	200	1989.8.28
---	-----------	-----	-----------

58.17435

247

注 意

- 1 借书到期请即送还。 25058
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

京卡0701

ISBN 7-03-001063-9

Q·162

定 价： 12.40 元

科技新书目： 194-079